

Función del factor LIM-HD Tailup en el notum de *Drosophila*

Memoria presentada por Joaquín de Navascués Melero
para optar al grado de doctor en ciencias
Madrid, mayo de 2007

Director de tesis: Juan Modolell Mainou
Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'
(UAM-CSIC)

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

índice general

Índice general	I
Índice de figuras	III
Summary	1
Abreviaturas	2
Nota	3
Introducción	4
I1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo	5
I2 El desarrollo del disco mesotorácico dorsal	6
Morfología del disco	7
Subdivisión del disco en linajes celulares	8
Subdivisión territorial del disco	11
Subdivisión del territorio de notum	13
I3 Los elementos de patrón en el notum	14
Los genes proneurales	15
El prepatrón y la regulación de <i>ac/sc</i>	16
Refinamiento del potencial proneural	17
Singularización de las CMOS	17
I4 El gen <i>tailup</i>	19
Los factores de transcripción LIM-HD	19
Cofactores de las proteínas LIM-HD	20
Los LIM-HD del grupo <i>islet</i>	23
Objetivos	26
Resultados	27
R1 Descripción molecular de los alelos <i>tup</i>	27
R2 Expresión de <i>tup</i> en tejidos imaginales	29
R3 <i>tup</i> es necesario para la especificación del notum, la integridad epitelial y el cierre dorsal adulto	31
R3-1 Fenotipos en la cutícula adulta	32
R3-2 Fenotipos en discos imaginales	37
Pérdida de afinidad celular	37
Los clones de <i>tup</i> en el notum expresan marcadores de axila	38
Efecto de los clones <i>tup</i> en marcadores de otros territorios	40
Los clones <i>tup</i> pierden expresión de marcadores de notum	41
El homeodominio de <i>Tup</i> es necesario para la especificación del notum	45
R4 <i>Chip</i> y <i>Ssdp</i> también se requieren en la especificación de notum	45
R5 <i>tup</i> y el C-Iro imponen sinérgicamente la identidad de notum	49
R5-1 La sobreexpresión de <i>tup</i> puede producir duplicaciones de notum	49
R5-2 La sobreexpresión conjunta de <i>tup</i> y <i>ara</i> produce más eficientemente tejido ectópico de notum	51
R6 <i>tup</i> participa en la formación del patrón de órganos sensoriales del tórax y de la cápsula cefálica dorsal	55
R6-1 <i>tup</i> tiene un efecto complejo en el patrón de macroquetas	56
R6-2 <i>tup</i> es necesario para la actividad del regulador-cis dorsocentral	59

R6-3 <i>tup</i> interacciona genéticamente con <i>emc</i> y <i>gbb</i>	60
R7 Regulación de la expresión de <i>tup</i>	62
R7-1 La vía del EGFR no afecta a la expresión de <i>tup</i>	62
R7-2 La señalización por Dpp activa la expresión de <i>tup</i>	63
R7-3 Exploración de otros posibles reguladores	66
Discusión	67
D1 Función de <i>tup</i> en la especificación del notum	67
D2 <i>Tup</i> actúa formando un complejo con <i>Chip</i> y <i>SsdP</i>	70
D2-1 El complejo hexamérico 2 <i>Tup</i> •2 <i>Chip</i> •2 <i>SsdP</i>	70
D1-1 Otras posibles interacciones de <i>Tup</i> que no se han detectado	71
D3 <i>tup</i> y el C-Iro cooperan en la especificación del notum	72
D4 Dpp y EGFR participan en la especificación del notum	74
D5 Función de <i>tup</i> en el patrón de órganos sensoriales	75
Conclusiones	78
Anexo I	79
Materiales y métodos	80
M1 Estirpes de <i>Drosophila</i>	80
M2 Caracterización de los alelos <i>tup</i>	81
Secuenciación de ADN genómico	81
Caracterización de los ARNm de <i>tup^{isl-1}</i> y <i>tup²</i>	82
M3 Obtención del alelo <i>tup^{ex4}</i>	84
M4 Generación de la construcción <i>UAS-tup^{IR}</i>	86
M5 Obtención del alelo <i>tup^{IQ3}</i>	87
M6 Generación de mosaicos genéticos	88
Recombinación con la inserción <i>FRT_{40A}</i>	88
Separación de letales asociados	88
Análisis clonal	90
M7 Sobreexpresión mediante el método Gal4/UAS	91
M8 Biología molecular	92
Técnica de ADN recombinante	92
Secuenciación y programas de análisis	92
Northern blot	93
M9 Morfología de estructuras adultas	93
Montaje y fotografía	93
Microscopía electrónica de barrido	93
M10 Detección de la expresión génica	94
Inmunodetección en tejidos	94
Hibridación in situ	94
Figuras suplementarias	96
Contenido del CD	100
Anexo II	101
Publicaciones del doctorando	102
Bibliografía	122

índice de figuras y tablas

Figura I1	5
Figura I2	7
Figura I3	9
Figura I4	10
Figura I5	12
Figura I6	14
Figura I7	15
Figura I8	18
Figura I9	20
Figura I10	22
Figura I11	24
Figura R1	27
Figura R2	29
Figura R3	30
Figura R4	33
Figura R5	34
Figura R6	36
Figura R7	38
Figura R8	39
Figura R9	41
Figura R10	42
Figura R11	43
Figura R12	44
Figura R13	46
Figura R14	47
Figura R15	48
Figura R16	50
Figura R17	51
Figura R18	52
Figura R19	54
Figura R20	56
Figura R21	57
Figura R22	58
Figura R23	59
Figura R24	61
Figura R25	63
Figura R26	64
Figura R27	65
Figura D1	75
Figura D2	76
Figura M1	82
Figura M2	83
Figura M3	85
Figura M4	86
Figura M5	87
Figura M6	89
Figura M7	90
Figura M8	92
Figura S1	96
Figura S2	96
Figura S3	97
Figura S4	97
Figura S5	98
Figura S6	98
Tabla R1	28
Tabla R2	32
Tabla R3	35
Tabla R4	55
Tabla R5	58
Tabla R6	61
Tabla S1	99

summary

BACKGROUND. In *Drosophila*, the notum territory of the wing disc is specified during the second larval instar. At this stage, notum formation depends on EGFR signalling pathway in the proximal part of the disc. This EGFR activity allows the growth of the notum primordium and activates the expression of the members of the *iroquois* complex (Iro-C), which endow the cells of the notum anlage with notum identity. Here we have characterized the function in this process of the LIM-HD gene *tailup* (*tup* = *islet*). This gene has been categorized as a prepatter gene that antagonizes formation of sensory bristles on the notum of *Drosophila*. This function apparently relies on inhibitory physical interactions of the Tup LIM domains with both Chip and Pnr, which are important activators of the expression of the proneural *achaete-scute* genes.

RESULTS. We show that *tup* is expressed from the early second instar on and that its activity is required during the specification of the notum territory. Absence of *tup* function causes cells of this anlage to upregulate different wing-hinge genes and to lose expression of some notum genes. Consistently, these cells differentiate hinge structures or modified notum cuticle. The LIM-HD cofactors Chip and SsdP are also necessary for notum specification; cells in the notum that lack any of these cofactors may express wing-hinge markers and lose notum markers, or even give rise to adults bearing ectopic hinge structures. This suggests that Tup acts in this process in a complex with Chip and SsdP. We have evaluated the relative capacity of *tup* and the Iro-C member *araucan* to impose a notum developmental fate on other territories. We find that overexpression of *tup*, together with *araucan*, a pronotum gene member of the Iro-C, synergistically reinforces the weak capacity of either gene overexpressed singly to induce ectopic notum-like development. We have analysed the effect of several signalling pathways on *tup* expression, and identified the Dpp pathway as a positive regulator, while those of Wg, EGFR, PVR and Hh have no direct role in *tup* regulation.

CONCLUSION. Our data support a model in which the EGFR and Dpp signalling pathways, with their respective downstream genes Iro-C and *tup*, converge and cooperate to commit cells to the notum developmental fate.

abreviaturas

<i>ac</i>	→	<i>achaete</i>
<i>act</i>	→	<i>actina</i>
ADN	→	ácido desoxirribonucleico
ADNc	→	ADN copia
<i>aos</i>	→	<i>argos</i>
<i>ap</i>	→	<i>apterous</i>
ARN	→	ácido ribonucleico
ARNm	→	ARN mensajero
<i>ara</i>	→	<i>araucan</i>
<i>arm</i>	→	<i>armadillo</i>
<i>ase</i>	→	<i>asense</i>
<i>Asx</i>	→	<i>Additional sex combs</i>
<i>Awh</i>	→	<i>Arrowhead</i>
<i>b</i>	→	<i>black</i>
bHLH	→	dominio básico hélice-lazo-hélice
<i>brk</i>	→	<i>brinker</i>
<i>brm</i>	→	<i>brahma</i>
<i>Bx</i>	→	<i>Beadex</i>
°C	→	grado centígrado
C-AS	→	Complejo <i>ac-sc</i>
<i>caup</i>	→	<i>caupolican</i>
C-E(spl)	→	Complejo <i>E(spl)</i>
<i>Chi</i>	→	<i>Chip</i>
<i>ci</i>	→	<i>cubitus interruptus</i>
C-Iro	→	Complejo <i>iro</i>
<i>ck</i>	→	<i>crinkled</i>
CLIM	→	cofactor of LIM-HD
CMOS	→	célula madre del órgano sensorial
<i>da</i>	→	<i>daughterless</i>
<i>Dad</i>	→	<i>Daughters against dpp</i>
DC	→	dorsocentral
DD	→	dimerization domain
DDH	→	después de la deposición del huevo
<i>dfr</i>	→	<i>drifter</i>
DfS	→	dominant female sterile
<i>DI</i>	→	<i>Delta</i>
dN ₆	→	hexanucleótido
<i>dpp</i>	→	<i>decapentaplegic</i>
DSHB	→	developmental studies hybridoma bank
<i>egfr</i>	→	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>emc</i>	→	<i>extramacrochaetae</i>
<i>en</i>	→	<i>engrailed</i>
<i>esg</i>	→	<i>escargot</i>
<i>E(spl)</i>	→	<i>Enhancer of split</i>
<i>eyg</i>	→	<i>eygone</i>
<i>Flp</i>	→	<i>Flipase</i>
<i>fng</i>	→	<i>fringe</i>
FRT	→	FLP recombination target
<i>gbb</i>	→	<i>glass bottom boat</i>
GFP	→	green fluorescent protein
<i>h</i>	→	horas
HD	→	homeodominio
<i>hh</i>	→	<i>hedgehog</i>
<i>hs</i>	→	<i>heat-shock</i>
<i>inv</i>	→	<i>invected</i>
<i>iro</i>	→	<i>iroquois</i>
<i>isl</i>	→	<i>islet</i>
JNK	→	<i>jun N-terminal kinase</i>
<i>lawc</i>	→	<i>legs arista wing complex</i>
LCCD	→	LDB/Chip-conserved domain
LDB	→	LIM domain-binding
LID	→	LIM-interacting domain
LMO	→	LIM domain-only
<i>l^{sc}</i>	→	<i>lethal of scute</i>
LUFS	→	LUG/LUH, Flo8, single-strand DNA-binding
mAb	→	anticuerpo monoclonal
MARCM	→	mosaic analysis with a repressible cell marker
min	→	minutos

<i>mirr</i>	→	<i>mirror</i>
<i>mkp3</i>	→	<i>MAPK phosphatase 3</i>
<i>msh</i>	→	<i>muscle specific homeobox</i>
<i>N</i>	→	<i>Notch</i>
<i>NLI</i>	→	<i>nuclear LIM interactor</i>
<i>nub</i>	→	<i>nubbin</i>
<i>omb</i>	→	<i>optomotor blind</i>
<i>opa</i>	→	<i>odd-paired</i>
<i>PBS</i>	→	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>Pc</i>	→	<i>Polycomb</i>
<i>PcG</i>	→	<i>grupo Polycomb</i>
<i>Pcl</i>	→	<i>Polycomblake</i>
<i>PCR</i>	→	<i>polimerase chain reaction</i>
<i>pnr</i>	→	<i>pannier</i>
<i>pnt</i>	→	<i>pointed</i>
<i>Psc</i>	→	<i>Posterior sex combs</i>
<i>ptc</i>	→	<i>patched</i>
<i>puc</i>	→	<i>puckered</i>
<i>por</i>	→	<i>PDGF- and VEGF-receptor related</i>
<i>RT</i>	→	<i>retrotranscripción</i>
<i>sal</i>	→	<i>salm, spalt major</i>
<i>sc</i>	→	<i>scute</i>
<i>SC</i>	→	<i>escutelar</i>
<i>sd</i>	→	<i>scalloped</i>
<i>sens</i>	→	<i>senseless</i>
<i>Ser</i>	→	<i>Serrate</i>
<i>SH</i>	→	<i>strong happening</i>
<i>smo</i>	→	<i>smoothened</i>
<i>Ssdp</i>	→	<i>Single-strand DNA-binding protein</i>
<i>t</i>	→	<i>tan</i>
<i>TCF</i>	→	<i>T-cell factor</i>
<i>tkv</i>	→	<i>thick veins</i>
<i>Trl</i>	→	<i>Trithorax-like</i>
<i>trx</i>	→	<i>trithorax</i>
<i>trxG</i>	→	<i>grupo trithorax</i>
<i>tsh</i>	→	<i>teashirt</i>
<i>TSM</i>	→	<i>twin sensilla of the wing margin</i>
<i>tub</i>	→	<i>tubulina</i>
<i>tup</i>	→	<i>tailup</i>
<i>twi</i>	→	<i>twist</i>
<i>UAS</i>	→	<i>upstream activating sequence</i>
<i>Ubx</i>	→	<i>Ultrabithorax</i>
<i>ush</i>	→	<i>u-shaped</i>
<i>vg</i>	→	<i>vestigial</i>
<i>vn</i>	→	<i>vein</i>
<i>vvl</i>	→	<i>ventral veins lacking</i>
<i>w</i>	→	<i>white</i>
<i>wg</i>	→	<i>wingless</i>
<i>y</i>	→	<i>yellow</i>
<i>zfh-2</i>	→	<i>zinc finger homeodomain-2</i>

nota

He intentado redactar esta tesis sin utilizar anglicismos de uso corriente en el día a día del laboratorio. Esto quizá entorpezca un poco la lectura de un experto, que encontrará raro leer ‘tratamiento a 37°C’ en vez de ‘choque térmico’ o directamente ‘heat shock’, por ejemplo. Pero considero que en un texto formal en castellano es necesario hacer un uso riguroso del vocabulario, aunque quizá se me haya escapado algún calco. Quisiera hacer mención concreta de tres términos o expresiones de uso particularmente raro en castellano, para prevenir de la traducción que hago:

- ‘enhancer’, que substituyo por ‘regulador-cis’.

- ‘proper disc’, que substituyo por ‘disco en sí’.

- y ‘splicing’, que substituyo por ‘ajuste’, dado que es la traducción más aceptada del término (Claros y cols., 2003).

introducción

La materia viva se distingue por su capacidad de reproducción, que probablemente sea su característica más definitoria. En los seres vivos unicelulares y en los coloniales más simples, esta propiedad se puede implementar por simple división. Sin embargo, cuando se trata de organismos estructuralmente complejos, formar un nuevo individuo requiere, partiendo de una única célula, la producción de una cierta masa celular, la especialización de las células para ejecutar distintas funciones vitales, y su organización conforme al plan morfológico de la especie. Esta etapa de progresión del organismo en construcción se denomina desarrollo.

La biología del desarrollo trata de describir los mecanismos genéticos, moleculares y celulares que integran los procesos de crecimiento, morfogénesis y diferenciación durante la formación de un nuevo espécimen. Sin embargo, los procesos de desarrollo no se circunscriben al periodo entre la fecundación y el nacimiento. Esto es evidente en el crecimiento continuo de las plantas vasculares, pero también se manifiesta en los animales en la existencia de fases juveniles, la metamorfosis, la capacidad de regeneración, la plasticidad neuronal o la inmunidad. Además, el control de los fenómenos de desarrollo conlleva la regulación de aspectos básicos de la biología celular y la fisiología, cuya pérdida en el adulto ya formado puede tener consecuencias patológicas. Por todo ello, el ámbito de estudio de la biología del desarrollo trasciende el periodo estrictamente embrionario.

El proceso ontogénico también tiene implicaciones más allá del ciclo vital del individuo. El estudio del desarrollo de organismos muy separados filogenéticamente indica que existen operaciones básicas que se resuelven por mecanismos celulares y genéticos muy conservados. Estos mecanismos han de ser robustos para garantizar el éxito reproductivo del individuo y sin embargo, la gran diversidad de tamaño, morfología y organización del ciclo vital entre especies evidencia su potencial flexibilidad. Los procesos por los que han aparecido tales variaciones son de gran interés para la biología evolutiva, y el carácter adaptativo de estas variaciones, por su adecuación al entorno, también es objeto de atención de la ecología. La biología del desarrollo, por tanto, aborda un problema central de la biología y conecta con muchas de sus ramas.

En esta tesis se ha abordado un aspecto del control genético de la diferenciación: la especificación territorial. A lo largo del desarrollo, la complejidad estructural se adquiere gradualmente. Conforme avanza este proceso, células embrionarias inicialmente equivalentes activarán distintos grupos de genes, cuyos productos repercutirán en las interacciones que mantengan los diversos grupos de células entre

sí, y esto a su vez generará nuevas diferencias genéticas entre ellas. Así, células que aún pueden ser indistinguibles citológicamente se segregan genéticamente, a veces de manera irreversible, y serán progresivamente asignadas a formar una parte determinada del organismo, mucho antes de adquirir sus propiedades funcionales últimas. La especificación previa a la diferenciación es un paso fundamental en la adquisición de la complejidad estructural.

I1 *Drosophila melanogaster* como modelo

Drosophila melanogaster (Meigen), la mosca del vinagre, se ha usado desde comienzos del siglo XX como animal de experimentación, por lo ventajoso de su cría en cautividad, puesto que es barata y apenas requiere cuidados, y por su rápido ciclo

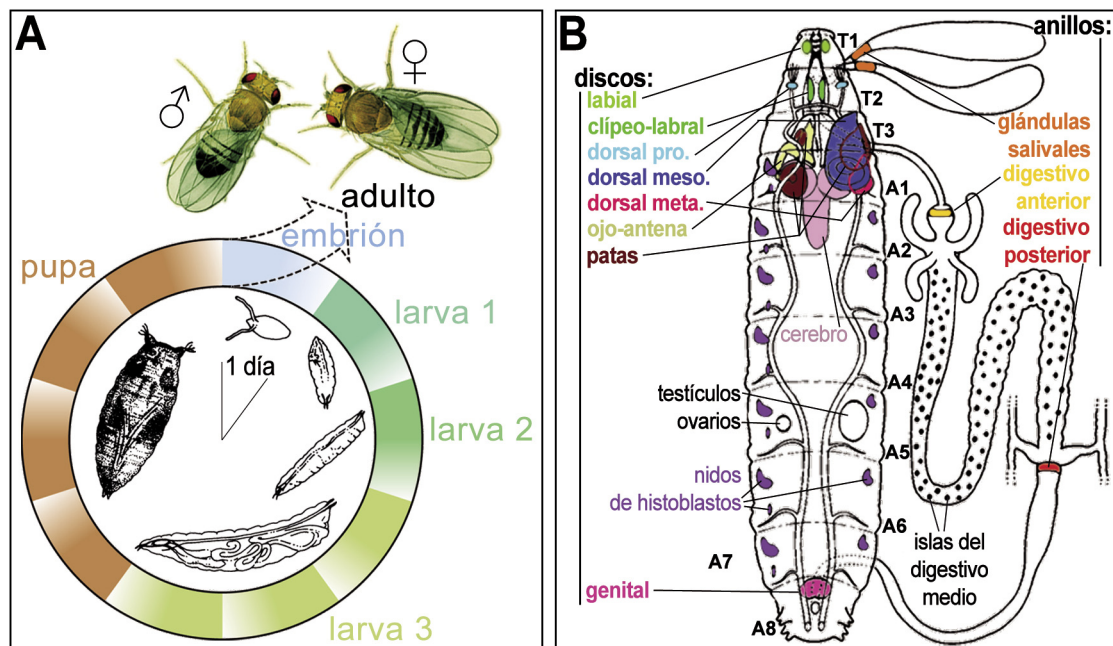


Figura 11. (A) El ciclo vital de *Drosophila* dura unos diez días a 25°C después de la deposición del huevo (DDH) hasta la eclosión del adulto. Modificado de Rubin (1988). (B) Estructuras imaginales en la larva. Los discos dorsales pro., meso. y meta. corresponden a los de húmero, ala/notum y halterio. Hay tres nidos de histoblastos por cada hemisegmento: los dorsales anterior y posterior (representados en el lado izquierdo) y el ventral (lado derecho). Los discos de la pata protorácica y la mesotorácica se representan en el lado izquierdo, anterior y posterior respectivamente, y el de pata metatorácica está en el lado derecho. Modificado de Bryant y Levinson (1985).

vital (Fig. 11.A). Actualmente, a esas ventajas se añade el detallado conocimiento que se tiene de esta especie, que abarca todos los aspectos de la biología. Su utilidad como modelo la avalan muchos descubrimientos relevantes; se han hecho singularmente conocidas las contribuciones de Thomas H. Morgan a la teoría cromosómica de la herencia (premio Nobel de Fisiología en 1933), las de Theodosius Dobzhansky a la teoría sintética de la evolución, o más recientemente las de Edward B. Lewis, Christiane

Nüsslein-Volhard y Eric F. Wieschaus al esclarecimiento del control genético del desarrollo embrionario (galardonados con el Nobel de Fisiología en 1995).

Drosophila melanogaster posee un plan de desarrollo holometábolo (con metamorfosis completa) en tres fases (Fig. I1.A): la embriogénesis, que termina con la eclosión del huevo, el periodo larvario (subdividido a su vez en 3 estadios separados por mudas), y el pupal (durante el que se produce la metamorfosis). Los insectos con desarrollo holometábolo dispusieron de ventajas como la rapidez de su ciclo vital y la adaptación a medios diversos (por la separación de las funciones de crecimiento y reproducción en formas corporales diferentes).

Durante la metamorfosis, los primordios de las estructuras adultas se ensamblan y se diferencian para formar el individuo adulto (el imago), mientras que la mayoría de los tejidos que formaban las estructuras larvarias sufren histólisis. Los primordios imaginales se especifican durante la embriogénesis y se mantienen en un estado indiferenciado durante el periodo larvario. En el plan ancestral de los holometábolos, los primordios del ectodermo (discos imaginales) son una continuidad tisular y funcional del epitelio larvario, apenas distinguible de éste, y se mantienen así hasta la etapa pupal o prepupal, durante la que crecen y se diferencian. Sin embargo, en *Drosophila* y otras especies holometábolos, los discos imaginales crecen profusamente desde el comienzo del periodo larvario y aparecen como una invaginación discernible histológicamente del epitelio larvario (los discos “clásicos”; Švácha, 1992). Asimismo, sus células se mantienen diploides frente a la endorreplicación que llevan a cabo las células larvarias (Hayashi y cols., 1993; Pearson, 1974). Cuando llega el periodo pupal, estos discos presentan un estadio de desarrollo mucho más avanzado que aquellos que siguen el plan ancestral; se ha propuesto que esto constituye una especialización para acortar aún más el ciclo vital (Švácha, 1992; Truman y Riddiford, 1999).

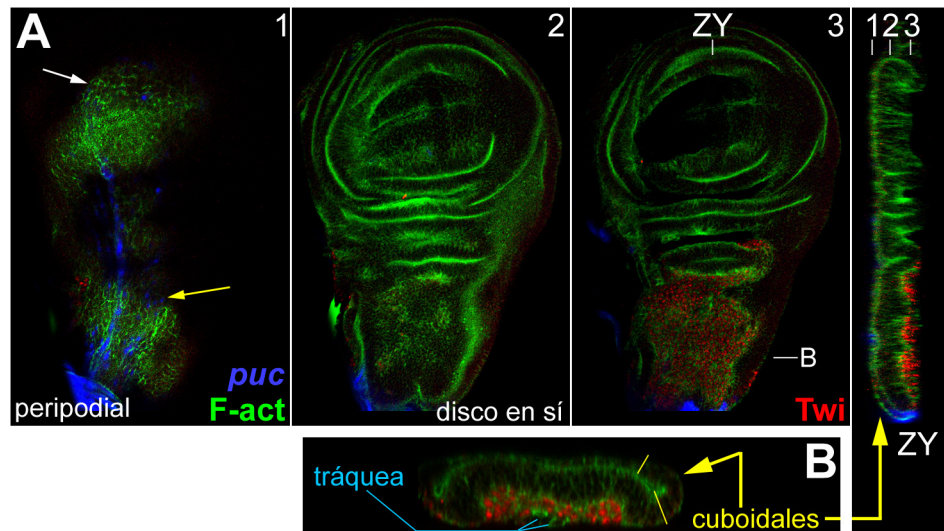
En la larva de *Drosophila melanogaster* hay veintiún discos imaginales “clásicos”: dos series contralaterales que dan lugar a la epidermis de la cabeza y el tórax, y otro disco con simetría bilateral para la genitalia (Fig. I1.B). La epidermis del abdomen, en cambio, proviene de los nidos de histoblastos, que tienen un plan de desarrollo más parecido al de los discos del holometábolo ancestral (García-Bellido y Merriam, 1971a; Guerra y cols., 1973). Existen otros primordios para el tubo digestivo, las glándulas salivales o la musculatura; otros órganos, como los túbulos de Malpigio o el cerebro, no se sustituyen sino que se remodelan durante la metamorfosis.

I2 El desarrollo del disco mesotorácico dorsal

En esta tesis se han empleado como objeto de estudio los discos dorsales del mesotórax, que dan lugar a su epidermis dorsal, el notum, y a las alas y las pleuras mesotorácicas (en adelante se denominarán “discos de ala/notum”). Los primordios de

los discos imaginales aparecen en la segunda mitad de la embriogénesis como grupos de 12-24 células (Bate y Martínez-Arias, 1991) que proliferan activamente durante los estadios larvarios. El disco de ala/notum contiene en la etapa prepupal unas 50 000 células (Bryant y Levinson, 1985; Madhavan y Schneiderman, 1977; revisado en Bryant y Simpson, 1984), lo cual coincide aproximadamente con la dotación celular de las estructuras del ala, el notum y la pleura mesotorácica del adulto (García-Bellido y Merriam, 1971b).

Figura I2. Morfología del disco imaginal de ala/notum. (A) La acumulación de filamentos de actina (revelada con faloidina, verde, F-act) permite distinguir las distintas morfologías celulares del disco de ala/notum. 1, 2, 3 son distintos planos XY del mismo disco, indicados en el panel ZY (que a su vez se indica en el 3). En 1 se pueden reconocer las células del epitelio escamoso por su anchura (flecha blanca). Parte de las células de la membrana peripodial quedan fuera del plano. La línea *puc^{E69}-lacZ* (azul) se expresa en la membrana peripodial (flecha amarilla en 1). En 2 se muestra una proyección de las células del “disco en sí”, más estrechas y altas (ver ZY). En 3 se muestra un plano basal del disco, en el que se detectan las células adepiteliales (marcadas con *Tw*, rojo). Se indican las proyecciones en ZY y B. (B) Proyección de otro disco a la altura del notum, aproximadamente como el que se indica en A-3, en el que se aprecian las células adepiteliales y la transición entre las células del disco, las cuboidales (entre las líneas amarillas, flechas amarillas en B y A-ZY) y las de la membrana peripodial. Por debajo de las células adepiteliales hay dos círculos de acumulación de F-actina correspondientes a secciones de la tráquea del disco.



Morfología del disco

El disco imaginal de ala/notum adopta pronto en el desarrollo larvario la forma de un saco aplanado, con una cara constituida por un epitelio columnar pseudoestratificado (el “disco en sí”) y la otra formada por un epitelio plano (la membrana peripodial, Fig. I2.A). Entre ambos tipos de células existe una morfología de transición, las células cuboidales, que continúan el disco en sí y lo unen con la membrana peripodial (Baena-López y cols., 2003, y la bibliografía que citan). En la boca del saco se encuentra el tallo, a través del cual el disco contacta con los tejidos larvarios. Además, una tráquea proporciona oxígeno al tejido, y bajo el epitelio columnar que dará lugar al notum se alojan las células adepiteliales (Fig. I2.B), que producirán en el adulto la mayor parte de los músculos de vuelo. Durante la pupación, los discos evaginarán y se fusionarán con los discos vecinos contralaterales e ipsilaterales, procesos en los que la membrana peripodial cumple una función mecánica (Pastor-Pareja y cols., 2004).

Subdivisión del disco en linajes celulares

El crecimiento y establecimiento del patrón en los discos imaginales depende en gran medida de su organización en compartimentos. Los compartimentos son subdivisiones del tejido basadas en dos propiedades: una, que las células pertenecientes a cada compartimento no se mezclan entre sí, pues poseen una afinidad diferencial; la otra, que la pertenencia de una célula a un compartimento es heredada por sus hijas. Por tanto, la linde entre compartimentos constituye un “borde de restricción de linaje” que separa dos poblaciones celulares, aunque no corresponde necesariamente con una frontera anatómica reconocible. La existencia de compartimentos en el desarrollo se demostró inicialmente en la cutícula de insectos mediante el análisis de clones de recombinación mitótica marcados genéticamente (García-Bellido y cols., 1976; García-Bellido y cols., 1973). También se han encontrado compartimentos en el desarrollo de los vertebrados (revisado en Dahmann y Basler, 1999; Irvine y Rauskolb, 2001; Lawrence y Struhl, 1996).

Para explicar la formación de los compartimentos surgió la noción del gen “selector” (García-Bellido, 1975) que se encargaría de determinar la identidad de las células del compartimento y de conferirles su adhesividad selectiva (García-Bellido, 1966; García-Bellido y Santamaría, 1972). En cuanto a la función de los compartimentos, se postuló que sus bordes podían constituir, en tanto que frontera física entre poblaciones celulares, un mecanismo para definir una fuente estable de emisión de moléculas difusibles (Blair, 1995; Meinhardt, 1983) (Fig. I3.B). Estas moléculas, los morfógenos, formarían un gradiente de distribución que induciría diferentes respuestas celulares según la concentración local (esto es, según su distancia con respecto a la fuente del morfógeno; véase Wolpert, 1989; Wolpert, 1996) (Fig. I3.B). El disco imaginal de ala/notum ha sido especialmente utilizado como sistema en el que comprobar la existencia de estos mecanismos y encontrar los genes que los gobiernan.

García-Bellido, Ripoll y Morata encontraron que el mesotórax dorsal está subdividido, en primer lugar, en un compartimento anterior y otro posterior (García-Bellido y cols., 1976; García-Bellido y cols., 1973) (Fig. I3.A). Esta división se repite en todos los segmentos del cuerpo de la mosca y se establece durante la embriogénesis. Los genes que controlan sucesivamente el establecimiento del eje anteroposterior, la segmentación y la polaridad segmental del embrión conducen a la expresión del gen *engrailed* (*en*) en el compartimento posterior de cada segmento (revisado en Ingham y Martínez-Arias, 1992; St. Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992) (Fig. I3.A,C). Así, cuando se determinan los primordios de los discos, estos contienen ya una población de células anteriores y otra de células posteriores. La expresión de *en* (y su parálogo *invected*, *inv*) determina la identidad de las células posteriores y el que produzcan la parte posterior del ala. De este modo, las células de origen posterior

mutantes para *en/inv* tras la metamorfosis dan lugar a estructuras anteriores, y aquellas células anteriores que expresan ectópicamente *en* sufren una transformación en tejido con identidad posterior (Fjose y cols., 1985; Guillen y cols., 1995; Kornberg y cols., 1985; Morata y Lawrence, 1975; Tabata y cols., 1995; Zecca y cols., 1995).

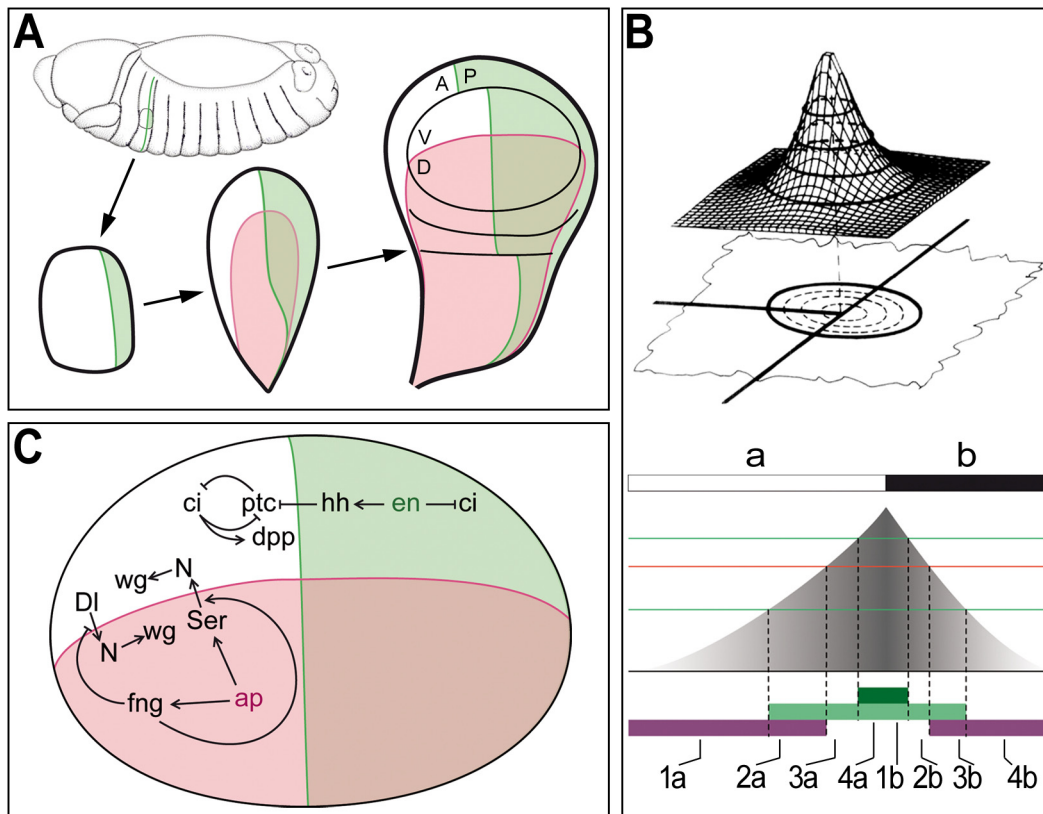


Figura 13. Los compartimentos en *Drosophila*. (A) Origen de los compartimentos del disco de ala/notum. El primordio del disco se establece en el segundo segmento torácico embrionario y hereda la subdivisión en compartimentos anterior y posterior (verde). Posteriormente adquiere la subdivisión dorsal (rojo) y ventral. (B) Arriba, representación de la interfase entre compartimentos (líneas rectas) como fuente de morfógenos (malla). Reproducido de Meinhardt (1983). Abajo, representación de un borde entre compartimentos a (vacío) y b (negro). La difusión de un morfógeno a partir de este borde (gradiente gris) y la respuesta diferencial de genes diana a este morfógeno (positiva en verde y negativa en rojo) permite establecer múltiples destinos celulares por combinación de los genes activos. (C) Esquema de regulación en torno a los bordes anteroposterior y dorsoventral del territorio de ala (ver texto principal).

en/inv codifican factores de transcripción de la familia HOX, cuyos miembros poseen una región de interacción con el ADN, el homeodominio (HD), que está altamente conservada (Coleman y cols., 1987; Fjose y cols., 1985; Poole y cols., 1985). Las capacidades de regulación de la transcripción de *en/inv* determinan a la vez la estabilidad del borde de compartimento y su función como organizador. Así, *en/inv* promueven en las células posteriores la activación del gen *hedgehog* (*hh*) (Lee y cols., 1992; Tabata y cols., 1992), que codifica una proteína secretable capaz de iniciar un proceso de señalización (Lee y cols., 1992; Mohler y Vani, 1992; Tabata y Kornberg, 1994; Zecca y cols., 1995; revisado en Torroja y cols., 2005). Simultáneamente, *en/inv* impiden que las células posteriores sean sensibles a la señalización por *hh* mediante la represión de *cubitus interruptus* (*ci*) (Eaton y Kornberg, 1990; Schwartz y cols., 1995), que es el efector de la vía de señalización de *hh* (revisado en Aza-Blanc y Kornberg, 1999). *hh* actúa como un morfógeno de corto alcance en las células anteriores cercanas al borde de compartimento (Mullor y cols., 1997) y determina, con cierta contribución de *en*, la diferencia de afinidad entre las células anteriores y posteriores (Blair y Ralston,

1997; Dahmann y Basler, 2000; Lawrence y cols., 1999; Rodríguez y Basler, 1997). Además *hh* activa, en aquellas células anteriores cercanas al borde del compartimento, la expresión de *decapentaplegic* (*dpp*) (Basler y Struhl, 1994; Capdevila y cols., 1994; Tabata y Kornberg, 1994), un homólogo de los factores difusibles BMP/TGF β , que actúa como morfógeno de largo alcance (Capdevila y Guerrero, 1994; de Celis y cols., 1996a; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Nellen y cols., 1996; Padgett y cols., 1987).

A la partición anteroposterior se añade, durante el primero o segundo estadio larvario (Klein, 2001), una subdivisión dorsoventral, que se regula según un esquema similar. El gen selector *apterous* (*ap*), que en este caso define el compartimento dorsal (Fig. I3.A,C) codifica un factor de transcripción de la familia LIM-HD (Blair y cols., 1994; Cohen y cols., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Williams y cols., 1993). La expresión de *ap* depende de la activación temprana de la vía de señalización intercelular del EGFR en la parte proximal del disco, de la que luego se independiza (Simcox, 1997; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b). *ap* confiere identidad a las células dorsales mediante la activación del gen *muscle specific homeobox* (*msh*, =*Drop*, =*Dorsal wing*), que determina la formación de las estructuras propias del ala dorsal (Milán y cols., 2001b; Tiong y cols., 1995), aunque existen datos que sugieren la existencia de otros factores independientes de *ap* (Klein y cols., 1998). Asimismo, *ap* dirige el establecimiento de las afinidades celulares dorsal y ventral (Milán y Cohen, 1999a; Milán y cols., 2001a), proceso que requiere también la actividad de la vía de señalización de Notch (N) (Micchelli y Blair, 1999; Milán y Cohen, 2003).

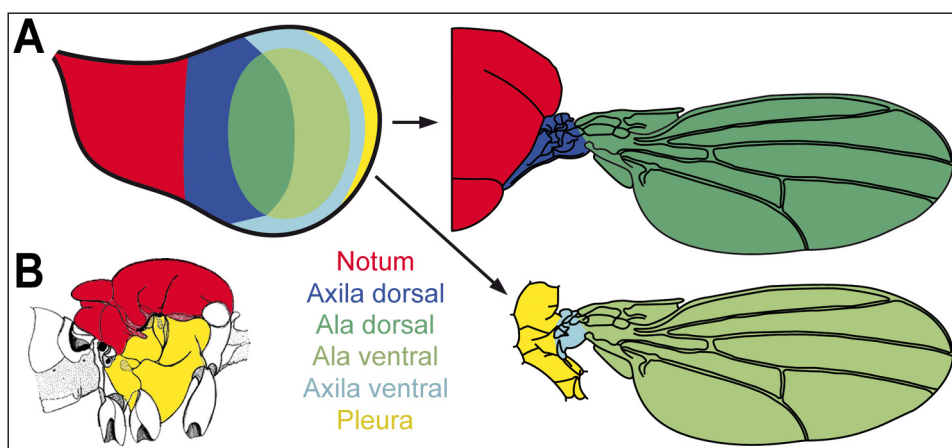


Figura I4. Mapa de destino del disco de ala/notum. (A) Esquema de los territorios presuntivos del disco de ala/notum (izquierda) y sus derivados adultos (derecha). La parte anterior queda hacia arriba. Modificado de Bryant (1978). (B) Esquema de la localización de los territorios de notum y pleura en una vista lateral del tórax (la parte anterior queda a la derecha). Modificado de Ferris (1965).

El establecimiento del borde dorsoventral depende de la actividad de la vía de N (revisado en Artavanis-Tsakonas y cols., 1995; Mumm y Kopan, 2000). *ap* activa en las células dorsales a *Serrate* (*Ser*) y a *fringe* (*fng*). *Ser*, y el producto del gen *Delta* (*Dl*), son ligandos de N asociados a membrana (Fehon y cols., 1990; Rebay y cols., 1991). *Fng*, en cambio, es una glicosil-transferasa que actúa sobre N (Brückner y cols., 2000;

Moloney y cols., 2000; Munro y Freeman, 2000), de modo que la afinidad de N por Ser disminuye, mientras que por Dl aumenta. Mediante este mecanismo, N sólo se activa en las células dorsales (por Dl) y ventrales (por Ser), que contactan unas con otras en el borde dorsoventral (de Celis y cols., 1996b; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Doherty y cols., 1996; Irvine y Wieschaus, 1994; Panin y cols., 1997). La señalización de N es fundamental para formar el borde dorsoventral y para activar la expresión de *wingless* (*wg*) (de Celis y García-Bellido, 1994; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Neumann y Cohen, 1996b; Rulifson y Blair, 1995), que a su vez parece actuar como un morfógeno de largo alcance (Neumann y Cohen, 1997; Zecca y cols., 1996).

Subdivisión territorial del disco

La actividad de los morfógenos parece diversificar las distintas identidades que confieren los genes selectores. Así, cualquier posición en el disco puede especificarse conforme a un sistema ortogonal de coordenadas. Sobre este esquema es ahora más fácil definir genéticamente las regiones del disco que producirán determinados derivados en el adulto (Fig. I4; revisado en Mann y Morata, 2000). Dos regiones básicas del mesotórax dorsal son el notum (la pared corporal) y el ala (el apéndice), cuya separación no involucra a un borde de linaje celular (Diez del Corral y cols., 1999), aunque presenta una cierta restricción clonal (García-Bellido y cols., 1976). Estas identidades territoriales ya no dependen de la presencia o ausencia de un único gen selector, sino que en cada territorio aparece una señal instructiva propia (revisado en Klein, 2001).

La actividad temprana de la ruta de señalización del EGFR en la región proximal del disco activa la expresión de los genes del complejo *iroquois* (C-Iro) en toda la región presuntiva de notum durante el segundo estadio larvario (Simcox, 1997; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b) (Fig. I5.A). El C-Iro se compone de tres genes, *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) y *mirror* (*mirr*), que codifican factores de transcripción con HD muy parecidos (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; McNeill y cols., 1997). Los genes del C-Iro se necesitan para determinar la identidad del notum, puesto que su ausencia en los primeros estadios larvarios transforma las células del notum en células de la axila alar dorsal (Diez del Corral y cols., 1999) (Fig. I5.C). Aparentemente, el nítido borde distal de expresión en el notum de los genes del C-Iro es también una fuente de señales difusibles de naturaleza desconocida (Diez del Corral y cols., 1999; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Asimismo, las células del territorio de notum adquieren una afinidad específica (Diez del Corral y cols., 1999; Fausto-Sterling y Hsieh, 1987).

Puesto que el borde de expresión de los genes del C-Iro no se determina por linaje, se necesita la presencia de factores adicionales que lo delimiten distalmente. Se sabe que la señalización de Dpp y el gen *msh* contribuyen a establecer el límite de expresión del C-Iro (Fig. I5.A). Cuando se elimina la función de *msh* o se inhibe la

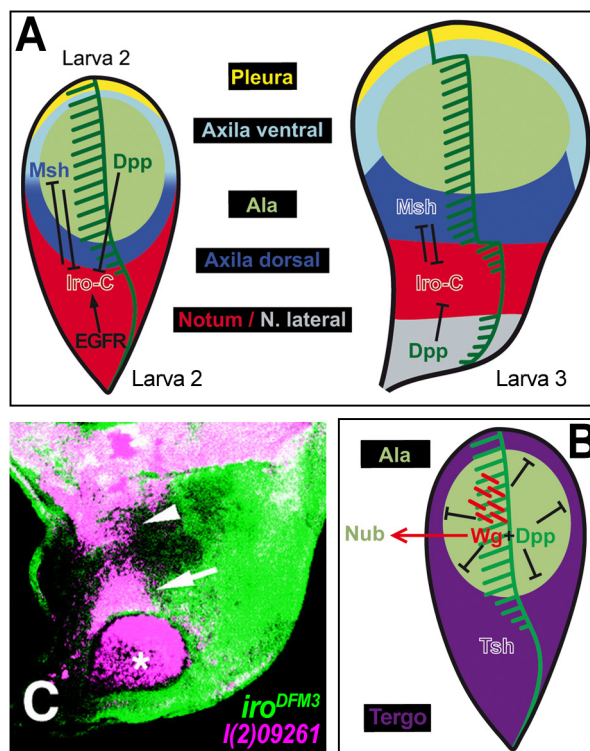


Figura I5. Subdivisión territorial del disco de ala/notum. (A) Regulación de la expresión del C-Iro. La señalización del EGFR desde la zona proximal del disco activa al C-Iro, mientras que *msh* y la señalización de Dpp lo restringen distalmente. Más tarde, la señalización de Dpp también restringe la expresión del C-Iro en la región proximal del notum (ver Fig. I6) y *msh* continúa su inhibición en la axila dorsal. (B) La inhibición de la expresión de *tsh* por la señalización de Wg y Dpp inicia la especificación del territorio de ala, que continúa con la activación de *nub*, entre otros genes, por la señalización de Wg. (C) El C-Iro define la identidad de notum, pues en su ausencia (clon *iro^{DFM3}*, falta de verde y asterisco) el tejido se transforma a axila, como indica la expresión ectópica de la línea *lacZ* *I(2)09261* (morado, ver Fig. R8.G para la expresión silvestre). La flecha apunta a una región de tejido silvestre que expresa no autónomamente *lacZ*, de manera simétrica al dominio silvestre (punta de flecha). Modificado de Díez del Corral y cols. (1999).

actividad de la vía de Dpp, la expresión de *ara/caup* se extiende por la región de la axila hasta el límite del territorio de ala (Cavodeassi y cols., 2002; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). El efecto de la vía de Dpp sobre el C-Iro se ha localizado en dos reguladores-cis (Letizia y cols., 2007). Uno de ellos, que responde negativamente a Dpp, reproduce el patrón general de expresión de los genes del C-Iro en el notum. El otro responde positivamente a la señal de Dpp proveniente del borde anteroposterior en el notum, y permite así una fuerte expresión de *ara/caup* en esa región. Por otro lado, la restricción que impone *msh* al C-Iro es recíproca, ya que *ara/caup* delimitan a su vez el borde proximal de expresión de *msh*. Esta represión mutua ayuda a establecer el abrupto borde de expresión del C-Iro en la frontera de los territorios de notum y axila dorsal (Villa-Cuesta y Modolell, 2005).

El territorio de ala, en cambio, se define por la actividad de *wg* en el segundo estadio larvario (Couso y cols., 1993; Ng y cols., 1996) (Fig. I5.B). La señalización por Wg reprime la expresión de *teashirt* (*tsh*) (Wu y Cohen, 2002) y activa la de *nubbin* (*nub*), *vestigial* (*vg*) y *scalloped* (*sd*) (Ng y cols., 1996; Williams y cols., 1993), genes que a su vez promueven la formación del tejido de ala y su organización próximo-distal (Baena-López y García-Bellido, 2003; Cifuentes y García-Bellido, 1997; Kim y cols., 1996; Ng y cols., 1995; Ng y cols., 1996; Williams y cols., 1993). La falta de función de algunos de estos genes conlleva la pérdida total o parcial del ala, mientras que la ausencia de señalización temprana de *wg*, así como algunas combinaciones mutantes de *vg*, desembocan en el desarrollo de un notum ectópico, que se dispone con simetría especular con respecto al notum normal (Couso y cols., 1993; Morata y Lawrence,

1977; Ng y cols., 1996; Sharma y Chopra, 1976; Williams y cols., 1993). La vía del EGFR cumple una doble tarea pues, siendo necesaria para la activación de *vg* (Nagaraj y cols., 1999), también se requiere durante el segundo estadio larvario para confinar la actividad formadora del ala de *wg* a la parte distal del disco (Baonza y cols., 2000).

La formación de la axila (entendida como la estructura que articula el ala, y no la parte proximal de ésta) parece depender de los genes *tsh* y *homothorax* (*hth*), que se necesitan para restringir el territorio de ala y ala distal (Azpiazu y Morata, 2000; Casares y Mann, 2000). La falta o disminución de la actividad de estos genes causa la malformación o desaparición de algunas estructuras de la axila (Casares y Mann, 2000; Soanes y Bell, 2001). En el caso de *hth*, el territorio mutante de axila puede transformarse en ala (Casares y Mann, 2000). En cambio, la sobreexpresión de *tsh* en el ala induce la formación de estructuras propias de la articulación (Azpiazu y Morata, 2000). La parte dorsal de la axila requiere también la contribución de *msh*, que delimita la extensión de este territorio con respecto al notum y, por tanto, su ausencia en la axila dorsal transforma las células de ésta en tejido de notum (Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Asimismo, parte de la región distal de la axila depende de la función mitogénica del llamado “anillo interno” de expresión de *wg* (Neumann y Cohen, 1996a).

Se ha propuesto que las estructuras de la región axilar proximal (pteralios tergaes: tégula y escleritos) derivan filogenéticamente de ciertos lóbulos laterales que proyectan desde la pared corporal o tergo, visibles en fósiles que presentan una morfología alar ancestral (Kukalová-Peck, 1978). Por tanto, notum y axila constituirían subdivisiones del tergo, lo que permitiría formar una estructura especializada en el control mecánico del apéndice (Diez del Corral y cols., 1999; Mann y Morata, 2000). Sin embargo, parte del desarrollo de la axila depende del ala, como se aprecia en los mutantes *ap*, en los que desaparece el ala y prácticamente toda su articulación, o *wg*, en los que apenas se ven vestigios de la axila entre el notum y su duplicado.

Subdivisión del territorio de notum

Especificados los principales territorios con identidad anatómica en el disco, éstos se subdividen para alcanzar su morfología y patrón adecuados. En el caso del notum, se conoce una serie de genes que delimita el desarrollo de sus diferentes partes, según su posición anteroposterior o próximo-distal (=medio-lateral; Fig. I6.A). Los genes del C-Iro, una vez especificado el territorio de notum, dejan de expresarse en su región proximal (=medial o central) y su actividad se restringe a la zona distal (=lateral), donde cumplen una función en la formación del patrón de órganos sensoriales (Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Leyns y cols., 1996). Este confinamiento de la expresión del C-Iro se debe a la actividad represora de la señalización de Dpp, junto con sus genes diana *u-shaped* y *pannier* (*ush* y *pnr*), cuyos

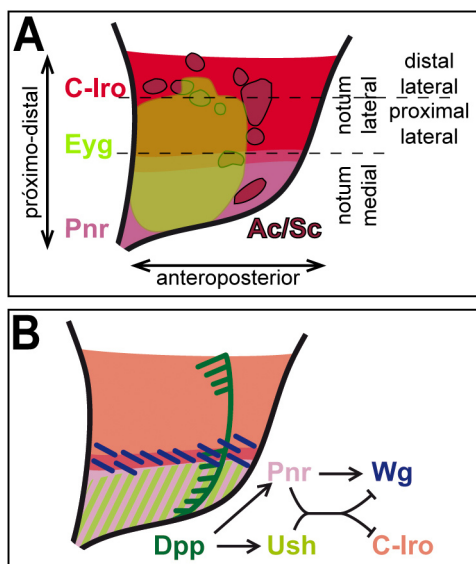


Figura I6. Subdivisión genética del territorio de notum. (A) El notum se subdivide próximo-distalmente en el territorio lateral (definido por la expresión del *C-Iro*) y el medial o central (definido por el dominio de expresión de *pnr*, aunque éste solapa un poco con el del *C-Iro*). En esta tesis se ha considerado el dominio de expresión de *eyg* para referirse, dentro del dominio lateral, a su parte más distal o proximal. La expresión de *ac/sc* se muestra como referencia (ver Fig. I7). (B) La subdivisión próximo-distal del notum y la expresión de *wg* en el notum dependen de la señalización de *Dpp*, que activa tanto a *pnr* como a *ush* y éstos regulan a su vez a *wg* y al *C-Iro*.

productos pueden formar un heterodímero con actividad represora (Calleja y cols., 2000; Cavodeassi y cols., 2002; Haenlin y cols., 1997; Letizia y cols., 2007; Sato y Saigo, 2000; Tomoyasu y cols., 2000). El propio *pnr*, que se expresa en la parte proximal del disco (Romain y cols., 1993), define las características de este territorio (Calleja y cols., 2000) e interviene también en el establecimiento del patrón de órganos sensoriales de esta zona (García-García y cols., 1999). *wg* y *ush* también presentan una restricción de expresión en el eje próximo-distal del notum (Fig. I6.B), y contribuyen a la formación del patrón de órganos sensoriales (Baker, 1988; Cubadda y cols., 1997; Haenlin y cols., 1997; Phillips y Whittle, 1993; Sato y Saigo, 2000; Tomoyasu y cols., 2000).

En el eje anteroposterior, *eygone* (*eyg*), y en menor medida su parólogo *twin of eyg* (*toe*), definen la región anterior del notum

(el scutum), que no se forma en su ausencia (Aldaz y cols., 2003). *eyg/toe* tienen el cometido de restringir anteriormente la expresión posterior de *hth* en el notum, que se necesita para la formación del scutellum (Aldaz y cols., 2005). La expresión ectópica de *eyg/toe* en el scutellum induce su conversión en tejido típico del scutum (Aldaz y cols., 2003). Los genes del complejo *Bar* también se expresan en un patrón anteroposterior, con una banda de expresión en la región anterior del scutum, donde se requieren para la formación de las microquetas de esta zona, y otro dominio de expresión en el postnotum (Sato y cols., 1999).

I3 Los elementos de patrón en el notum

La cutícula de *Drosophila melanogaster* contiene una multitud de elementos diversos, que aparecen en posiciones invariables del cuerpo de la mosca (como se añaden los detalles de un dibujo a un boceto). A su distribución sobre la estructura corporal se denomina "patrón". En el metatórax dorsal, estos elementos son los órganos sensoriales (OS) del sistema nervioso periférico y las venas que surcan el ala (Fig. I7.A). En el notum, los órganos sensoriales son mecanorreceptores en forma de vibrisas que se conocen como quetas (también cerdas o sedas). Existen unas 210-250 cerdas de pequeño tamaño (microquetas), distribuidas en filas, y otras once mayores

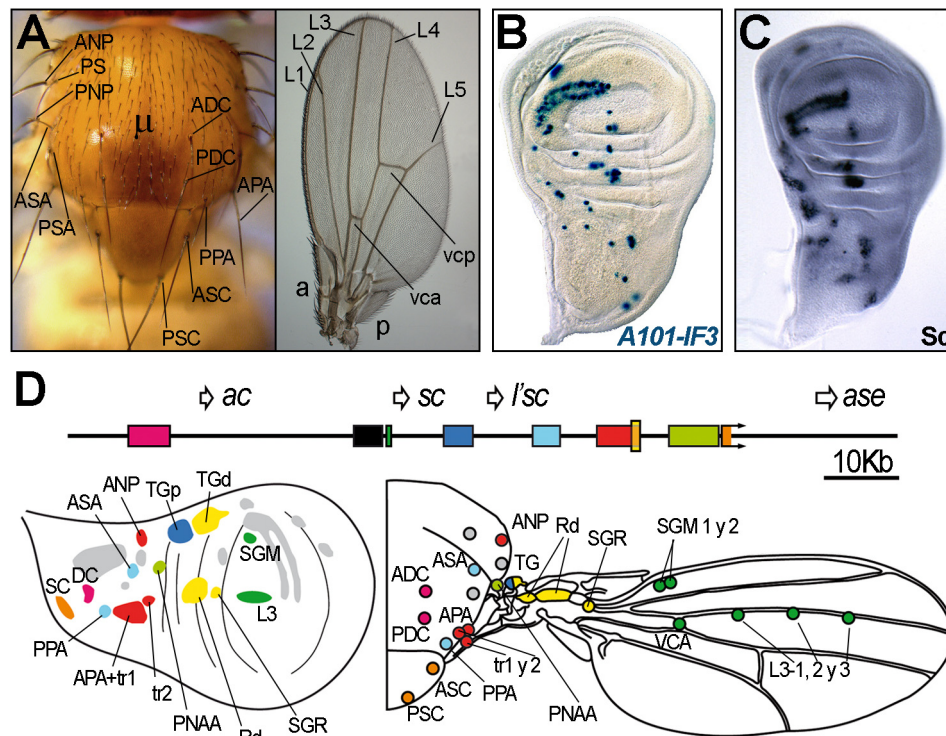


Figura I7. El patrón de órganos sensoriales del notum. (A) Elementos de patrón en el mesotórax dorsal de *Drosophila*. Izquierda, patrón de cerdas del notum (imagen original cedida por Juan Modolell). Derecha, patrón de venas del ala (imagen original cedida por Joaquim Culí). a y p, anterior y posterior. L1-5, venas longitudinales 1 a 5. vca y vcp, venas cruzadas a y p. ANP y PNP, a y p notopleurales. PS, presutural. ASA y PSA, a y p supraalares. APA y PPA, a y p postalares. ADC y PDC, a y p dorsocentrales. ASC y PSC, a y p escutelares. μ , campo de microquetas. (B) Distribución de las CMOS en el disco de ala/notum, revelada por la expresión de la línea lacZ *A101-IF3*. Imagen cedida por Juan Modolell. (C) Grupos proneurales, revelados por la distribución de la proteína Sc. Imagen cedida por Juan Modolell. (D) Mapa del C-AS, sus reguladores-cis y la correspondencia de éstos con los grupos proneurales y los órganos resultantes. tr1 y 2, sensilas tricoideas 1 y 2. PNAA, proceso notoalar anterior. Rd, radio dorsal. SGR, sensila gigante del radio. SGM, sensilas gemelas del margen del ala. TGp y TGd, tégula proximal y distal. Las cajas representan los reguladores-cis de los grupos proneurales y los órganos sensoriales del color correspondiente. La caja negra representa el regulador específico de las CMOS.

(macroquetas), que se disponen en posiciones tan constantes de un individuo a otro que cada una tiene denominación propia (Ferris, 1965; Hartenstein y Posakony, 1989) (Fig. I7.A).

Los OS proceden de una única célula precursora, la célula madre del órgano sensorial (CMOS), cuyas células hijas, de manera determinada por su linaje, dan lugar a la neurona que inerva el órgano y a las diferentes estructuras de éste (Bodmer y cols., 1989; Hartenstein y Posakony, 1989). Las CMOS se especifican en los discos imaginales en las posiciones presuntivas que ocuparán los correspondientes OS (Cubas y cols., 1991; Huang y cols., 1991; Skeath y Carroll, 1991) (Fig. I7.B). Por tanto, el control genético del posicionamiento de los OS consiste, en gran medida, en determinar la posición de dichas CMOS en los discos (revisado en Campuzano y Modolell, 1992; Ghysen y Dambly-Chaudière, 1989; Modolell y Campuzano, 1998).

Los genes proneurales

Los genes que determinan la capacidad de una célula para convertirse en la CMOS de un OS externo son *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*), miembros del complejo *ac/sc*

(C-AS) (Fig. I7.D). Los genes del C-AS codifican factores de transcripción con un dominio básico/hélice-lazo-hélice (bHLH). Mediante su dominio HLH, Ac/Sc dimerizan con el producto del gen *Daughterless* (*Da*), también un factor bHLH, y los dímeros Ac/Sc•Da se unen al ADN a través de los dominios básicos (revisado en Campuzano y Modolell, 1992; Garrell y Campuzano, 1991).

Siendo la CMOS un precursor neural, estos genes se denominan “proneurales”; en mutantes nulos del C-AS no se especifican las CMOS ni, por tanto, se forman los OS, mientras que mutaciones de exceso de función producen órganos supernumerarios (revisado en Campuzano y Modolell, 1992; Modolell y Campuzano, 1998).

El prepatrón y la regulación de *ac/sc*

Sin embargo, muchas mutaciones de pérdida parcial de función del C-AS conllevan la pérdida de los OS de ciertas posiciones, y no de otras. Esto condujo a proponer la existencia de un “prepatrón” que determinaba las regiones donde debían formarse las quetas (Stern, 1954). Más adelante se observó que muchas mutaciones que eliminaban los OS de posiciones específicas afectaban a regiones intergénicas del C-AS. Así, se postuló que el prepatrón operaba a través de secuencias reguladoras en cis (reguladores-cis) controladas por combinaciones de factores que, localmente, activaban la expresión de los genes *ac/sc* (Ghyssen y Dambly-Chaudière, 1988; Leyns y cols., 1989; Ruiz-Gómez y Modolell, 1987) (Fig. I7.D).

En los discos imaginales, la expresión de los genes proneurales ocurre en grupos de 20-30 células que tienen una forma, dimensión y localización típicas dentro de cada disco. Estos campos de células se denominan grupos proneurales (Fig. I7.C-D), y es en posiciones específicas dentro de estos grupos donde aparecen las CMOS. Estas posiciones se definen por la acumulación de cantidades de Ac/Sc mayores que en las demás células (Cubas y cols., 1991; Romani y cols., 1989; Skeath y Carroll, 1991). Estos precisos dominios de expresión responden muy bien al concepto de prepatrón y, en efecto, se ha comprobado que en el C-AS existen numerosas secuencias reguladoras responsables de la expresión de sus genes en distintos grupos proneurales (García-García y cols., 1999; Gómez-Skarmeta y cols., 1995; Martínez y Modolell, 1991) (Fig. I7.D).

El control de los reguladores-cis mediante combinaciones de factores también se ha demostrado, pues se han identificado algunos de estos factores. Es el caso de *pnr*, *ush* (ver sección I4), los genes del complejo *spalt/spalt-related* y los de los C-Iro y C-Bar, que afectan a OS localizados en distintas regiones (de Celis y cols., 1999; García-García y cols., 1999; Gómez-Skarmeta y cols., 1996; Leyns y cols., 1996; Sato y cols., 1999; revisado en Gómez-Skarmeta y cols., 2003). Las vías de señalización de *dpp* y *wg* también se han descrito como controladoras del prepatrón (Phillips y Whittle, 1993; Tomoyasu y cols., 1998). Mientras, el represor codificado por *hairy* parece actuar

sobre los promotores de *ac/sc* y limita así su expresión (Carroll y Whyte, 1989; Moscoso del Prado y García-Bellido, 1984; Ohsako y cols., 1994; Van Doren y cols., 1994). Así, el conjunto de reguladores-cis del C-AS funciona como un mecanismo para integrar e interpretar las indicaciones posicionales que ofrecen los genes que subdividen genéticamente el disco.

Cabe destacar, como nivel adicional de regulación, que una vez comenzada la expresión de *ac/sc* en los grupos proneurales, *Ac/Sc* dirigen la expresión de *charlatan*, un factor de transcripción que refuerza la actividad de todos los reguladores-cis (Escudero y cols., 2005).

Refinamiento del potencial proneural

El control combinatorial de la expresión de *ac/sc* por medio de reguladores-cis explica la formación de grupos proneurales en posiciones específicas. Sin embargo, cuando se fuerza la expresión generalizada y transitoria de *sc* en los discos imaginales de ala/notum que carecen de la expresión endógena de los genes proneurales, aparecen órganos sensoriales en posiciones concretas y cercanas a las normales (Rodríguez y cols., 1990). Esto indica la existencia de claves adicionales que condicionan espacialmente la competencia para producir OS.

Uno de los factores que contribuyen a definir la posición de los OS es *extramacrochaetae* (*emc*), que genéticamente se comporta como un represor de *ac/sc* (Botas y cols., 1982; Moscoso del Prado y García-Bellido, 1984). *emc* codifica una proteína HLH carente del dominio básico de unión al ADN (Ellis y cols., 1990; Garrell y Modolell, 1990), de modo que puede dimerizar con las proteínas proneurales e impedir su unión al ADN (Martínez y cols., 1993; Van Doren y cols., 1991). Aunque *emc* se requiere ubicuamente para la viabilidad celular en discos imaginales (García-Alonso y García-Bellido, 1988), su ARNm se detecta en un patrón espacial determinado (Cubas y Modolell, 1992; Van Doren y cols., 1992) que se superpone parcialmente al de *ac/sc*. Así, *Emc* restringe la competencia neural de las células que lo expresan, secuestrando las proteínas proneurales. Las CMOS, tanto si proceden de un grupo proneural silvestre como de la expresión ectópica de *sc*, aparecen en las regiones donde *emc* no se expresa o se expresa en menor cantidad (Cubas y Modolell, 1992).

Singularización de las CMOS

La expresión de *ac/sc* en pequeños grupos de células no explica que en cada grupo se seleccionen una o muy pocas CMOS en posiciones determinadas. Esta “resolución” se debe a interacciones celulares negativas dentro del grupo proneural, mediadas por la ruta de señalización de N, y denominadas “inhibición lateral” (revisado en Simpson, 1990; Simpson, 1997).

La inhibición lateral ocurre entre células adyacentes y se basa en bucles de retroalimentación entre *ac/sc* y la ruta de señalización de N activada por DI (Heitzler y Simpson, 1991) (Fig. I8). *Ac/Sc* promueven la actividad de DI, de forma poco conocida. DI a su vez estimula el procesamiento de N en las células vecinas, y esto inicia un proceso de señalización que activa la transcripción de genes del complejo *Enhancer of split* [C-E(spl)], que codifican factores bHLH de una subfamilia diferente a la de las proteínas proneurales (revisado en Massari y Murre, 2000). Las proteínas proneurales activan un regulador-cis del C-AS que es independiente del prepatrón y específico de las CMOS (Culí y Modolell, 1998). En cambio, factores del C-E(spl) actúan negativamente sobre este regulador-cis. Aunque los factores bHLH del C-E(spl) pueden regular negativamente los genes diana de las proteínas proneurales, uniéndose a secuencias diferentes a las que unen los dímeros *Ac/Sc•Da* (revisado en Fisher y Caudy, 1998; Massari y Murre, 2000), su efecto sobre el regulador-cis de las CMOS depende de interacciones proteína-proteína. Los miembros del C-E(spl) M7 y M γ pueden interaccionar físicamente con Sc, a través de un dominio de trans-activación en la región C-terminal de éste. A este complejo *Da•Ac/Sc•E(spl)*, unido al regulador-cis de las CMOS, se une el correpresor Groucho a través del factor

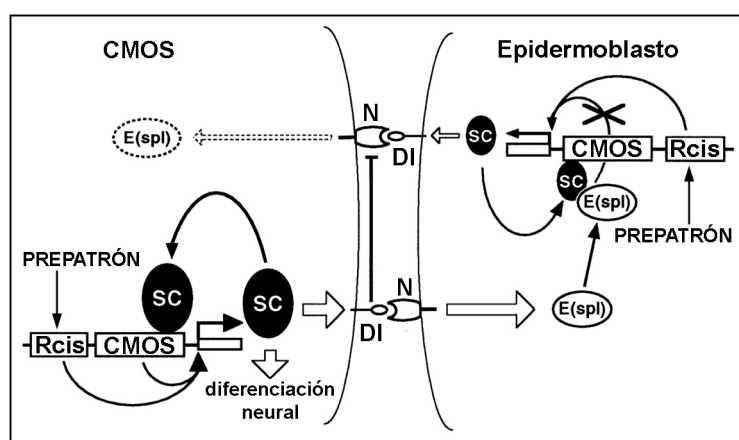


Figura I8. Esquema de funcionamiento de la inhibición lateral. Inicialmente, los reguladores-cis del C-AS (caja Rcis) responden al prepatrón y activan a *ac/sc* en grupos proneurales. *Ac/Sc* (SC en la figura) inducen la actividad del regulador-cis específico de las CMOS (caja CMOS), y promueven la activación de la vía de N en las células vecinas. La ruta de N activa la expresión de E(spl), que se une a SC e inhibe la actividad del regulador de las CMOS. Por encima de un cierto umbral de SC se inicia la diferenciación neural. Modificado de Culí y Modolell (1998).

E(spl) (Giagtzoglou y cols., 2003; Giagtzoglou y cols., 2005; Paroush y cols., 1994). Así, las células del grupo proneural inhiben mutuamente el regulador-cis de las CMOS y éstas no pueden especificarse como CMOS. Solamente cuando una de ellas escapa de esta inhibición puede activar este regulador, acumular más proteína proneural que sus vecinas y devenir CMOS. (Esto ocurre generalmente en una posición muy específica dentro del grupo proneural, probablemente determinada por un alto contenido en proteínas proneurales.) Una vez especificada la CMOS, al tener ésta mucha más proteína proneural que sus vecinas, activa fuertemente la ruta de N en sus vecinas e

impide que estas inicien el bucle positivo de Ac/Sc sobre el regulador de las CMOS, y así estas células se diferencian como epidermoblastos.

Así descrita, la inhibición lateral sólo explicaría el espaciamiento regular de las microquetas (Simpson, 1997), pero no la especificación de las CMOS de las macroquetas en zonas constantes dentro de cada grupo proneural (Collier y cols., 1996; Simpson, 1997). Por tanto, la especificación de las CMOS de las macroquetas está sesgada y la inhibición lateral sólo la termina de definir. El sesgo en la función proneural parece claramente determinada por la actividad de *Emc*, aunque podrían existir factores adicionales, además de posibles inhomogeneidades de partida en la expresión de *ac/sc* causadas por el propio prepatrón.

I4 El gen *tailup*

El gen *tailup* (*tup*), también conocido como *islet* (*isl*) en *Drosophila* y en vertebrados, codifica un factor LIM-HD (Thor y Thomas, 1997). Los miembros de esta familia son reguladores transcripcionales que poseen dos dominios LIM y un HD característico (revisado en Dawid y cols., 1995; Hobert y Westphal, 2000). Esta composición estructural les confiere unas capacidades particulares de interacción y regulación (revisado en Bach, 2000; Dawid y cols., 1998; Rétaux y Bachy, 2002).

Los factores de transcripción LIM-HD

Aparte de las peculiaridades de secuencia de los HD de estos factores, lo realmente definitorio de la familia es la presencia en posición N-terminal, respecto del HD, de dos dominios LIM en tándem (Fig. I9.A). El dominio LIM se denominó así por las iniciales de los tres primeros miembros de la familia, *Lin-11*, *Isl1* y *Mec-3* (Freyd y cols., 1990; Karlsson y cols., 1990; Way y Chalfie, 1988). El dominio LIM consiste en dos dedos de zinc con plegamiento en “clave de sol” (Fig. I9.B), separados por dos residuos, con un consenso general para los ligandos metálicos (Fig. I9.B) sobre el que caben algunas variaciones (revisado en Kadrmas y Beckerle, 2004; Sánchez-García y Rabbitts, 1994).

Estos dedos de zinc son bastante similares a los de los factores GATA y los receptores nucleares que se unen al ADN. Sin embargo, los dominios LIM están principalmente implicados en interacciones proteicas (Feuerstein y cols., 1994; Schmeichel y Beckerle, 1994; revisado en Gill, 1995; Kadrmas y Beckerle, 2004). Cabe destacar que los factores LIM-HD son las únicas homeoproteínas que poseen un dominio claramente dedicado a las interacciones proteína-proteína, con la excepción de los factores HOX de los complejos homeóticos, que poseen un pequeño motivo de interacción con proteínas (Hobert y Westphal, 2000; Mann, 1995). Los dominios LIM, al contrario que otros motivos de unión a proteínas, no promueven interacciones

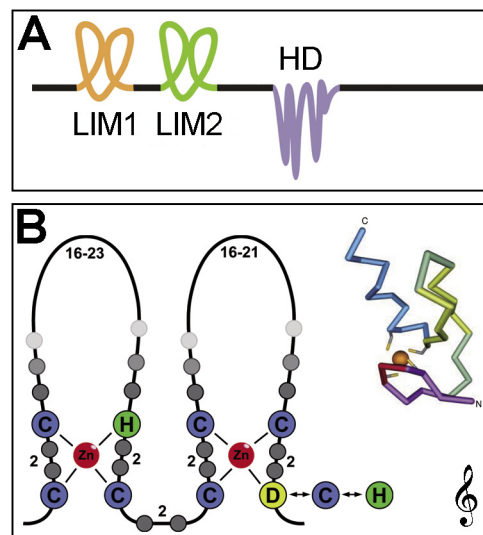
específicas con dianas definidas, sino que parecen constituir un armazón estructural cuya capacidad de interacción la determinan las variaciones que se producen en cada factor LIM. Posiblemente es esta versatilidad la que ha propiciado que los dominios LIM se hallen tanto en proteínas nucleares como citoplasmáticas con funciones muy diversas, y en combinación con otros dominios funcionales (Kadrmas y Beckerle, 2004). La familia de factores LIM-HD se subdivide en varios grupos por su similitud de secuencia (Hobert y Westphal, 2000): son los grupos de Apterous, Lhx6, Islet, Lmx, Lim-1 y Lim-3 (que parece ser el más parecido al LIM-HD ancestral; Larroux y cols., 2006). Además de dos dominios LIM y el homeodominio, cada grupo puede contener motivos adicionales (Curtiss y Heilig, 1998).

Los factores LIM-HD desempeñan diversas funciones en el desarrollo (revisado en Hobert y Westphal, 2000; Hunter y Rhodes, 2005). Entre ellas, destaca la diferenciación terminal de motoneuronas e interneuronas, proceso en el que están involucradas de manera no redundante casi todas las subclases de LIM-HD. Tanto en nemátodos y *Drosophila* como en vertebrados, la combinación de factores LIM-HD presentes en una neurona postmitótica determina su patrón neurosecretor, la trayectoria de sus axones y, en algunos sistemas, su supervivencia, lo que ha llevado a proponer la existencia de un “código LIM-HD” para el desarrollo de las motoneuronas e interneuronas (Thor y cols., 1999; Tsuchida y cols., 1994; revisado en Shirasaki y Pfaff, 2002; Sockanathan, 2003). En este control combinatorial parecen intervenir también proteínas bHLH (Lee y Pfaff, 2003; ver también Allan y Thor, 2003). Además de esta función común en el sistema nervioso, los distintos LIM-HD participan en la especificación o regionalización de diferentes órganos, como los riñones, el corazón, la pituitaria, las gónadas, los pulmones y los dientes, o de grandes estructuras, como la cabeza, y en la diferenciación y formación de tipos celulares eritropoyéticos, pancreáticos y hepáticos (Wandzioch y cols., 2004; revisado en Hobert y Westphal, 2000; Hunter y Rhodes, 2005).

Cofactores de las proteínas LIM-HD

Las interacciones proteína-proteína mediadas por los dominios LIM son fundamentales para la ejecución de las funciones de los LIM-HD. Los factores con

Figura I9. Organización de las proteínas LIM-HD. (A) Organización de los factores LIM-HD en dominios funcionales. (B) Izquierda: secuencia consenso de los dominios LIM $[CX_2CX_{16-23}HX_2CX_2CX_2CX_{16-21}CX_2(C/H/D)]$ y su organización en dedos de Zinc. Derecha: representación del plegamiento típico de los dedos de Zinc de los dominios LIM, llamado de “clave de sol” por su parecido con el símbolo de notación musical (esquina inferior derecha).

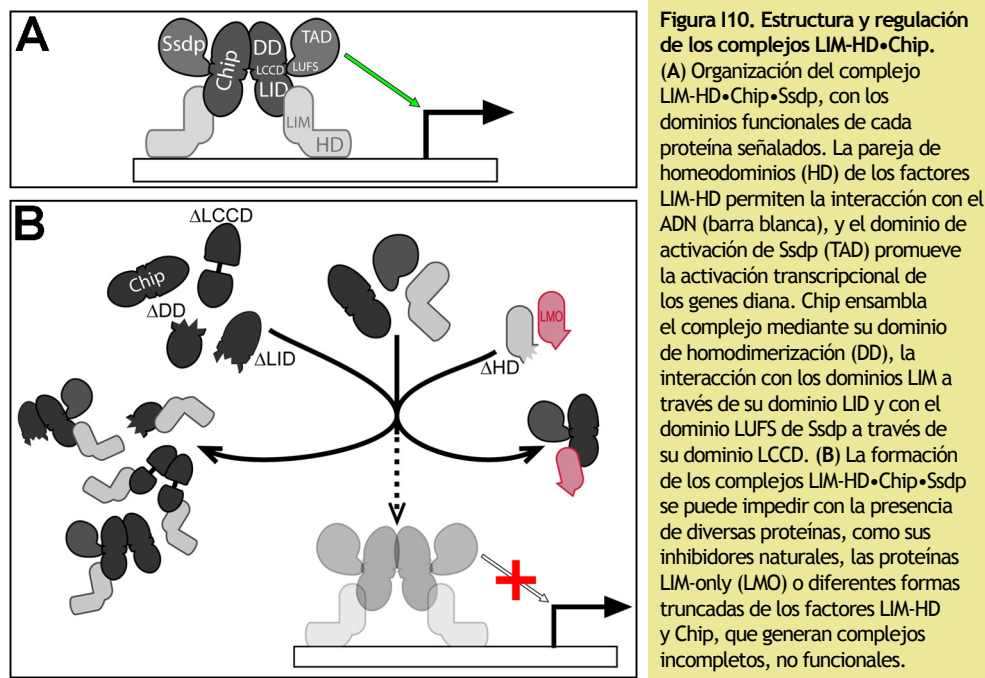


los que se han observado uniones físicas incluyen homeoproteínas de la familia Pit-Oct-Unc (POU-HD) (Bach y cols., 1995; Xue y cols., 1993), receptores nucleares (Eeckhoutte y cols., 2006; Gay y cols., 2000), la ubiquitín-ligasa RLIM (Bach y cols., 1999), los homeodominios de otros factores LIM-HD (Thaler y cols., 2002), entre otras. Además de estas interacciones, dependientes de contexto y específicas de ciertos factores LIM-HD, todos ellos pueden interaccionar con la proteína LIM Domain-Binding (LDB) (Agulnick y cols., 1996; Jurata y cols., 1998). La función de LDB (también Cofactor of LIM-HD proteins, CLIM, Nuclear LIM Interactor, NLI, o Chip/dLBD, en *Drosophila*) es fundamental en la actividad de los factores LIM-HD en muchos contextos, y además puede interaccionar con muchos otros factores (revisado en Matthews y Visvader, 2003); ver también, para ejemplos en *Drosophila*, Pueyo y Couso (2004).

El caso mejor conocido, que sirve de ejemplo de la relación funcional entre LDB y los LIM-HD, es el de Chip y Apterous en el compartimento dorsal del ala de *Drosophila*. Chip se encuentra en forma de homodímeros, gracias a su dominio de dimerización (DD) (Fig. I10.A). Además, posee un dominio de interacción con LIM (LID), por el que puede unirse a Ap y los demás LIM-HD (Biryukova y Heitzler, 2005; Milán y Cohen, 1999b; Morcillo y cols., 1997; Torigoi y cols., 2000; van Meyel y cols., 1999). Así, Ap y Chip forman un complejo funcional tetramérico, cuya arquitectura requiere que sus miembros estén en cantidades relativas adecuadas. La simple reducción de una copia del locus *Chip* impide la formación correcta del margen del ala (Fernández-Fúnez y cols., 1998; Morcillo y cols., 1996), y la sobreexpresión de *Chip* en cantidades crecientes puede mimetizar desde la haploinsuficiencia de *Chip* hasta el fenotipo de mutantes nulos para *ap* (Fernández-Fúnez y cols., 1998; Milán y Cohen, 1999b; Rincón-Limas y cols., 2000). Este efecto se debería a que el exceso de Chip secuestraría a Ap en complejos incompletos, no funcionales (Fig. I10.B), y por tanto puede corregirse incrementando simultáneamente la cantidad de Ap (Milán y Cohen, 1999b). En cambio, la sobreexpresión de versiones truncadas de Chip/LDB (Fig. I10.B), que tiene también efectos dominantes negativos (Bach y cols., 1999; Becker y cols., 2002; Milán y Cohen, 1999b; van Meyel y cols., 1999; van Meyel y cols., 2003), no puede compensarse aumentando la cantidad de Ap (Milán y Cohen, 1999b). En *Xenopus* se ha descrito un mecanismo para asegurar la proporción entre LDB y el LIM-HD Xlim-1 durante la formación del organizador de Spemann, por el que las moléculas de LDB no unidas a un LIM-HD serían poliubiquitinadas por la E3 ubiquitín ligasa RLIM (también cofactor específico de los LIM-HD; Bach y cols., 1999; Ostendorff y cols., 2002), y degradadas por el proteasoma, asegurando de este modo el correcto funcionamiento del tetrámero 2Xlim-1•2LDB (Hiratani y cols., 2003).

La actividad de unión al ADN de los tetrámeros 2Ap•2Chip, que depende de los homeodominios de Ap, es susceptible de regularse por la proteína LIM-only de *Drosophila* (dLMO), codificada por el locus *Beadex/heldup-a* (Milán y cols., 1998; Shores y cols., 1998; Zeng y cols., 1998). dLMO es una proteína con dos dominios LIM

en disposición similar a la de los factores LIM-HD, pero carente del homeodominio. Debido a su estructura, dLMO puede competir con Ap en su interacción física con Chip (Fig. I10.B), interfiriendo así con la formación de un tetrámero capaz de unirse al ADN (Milán y Cohen, 1999b; Milán y cols., 1998). La expresión de *Bx* depende de la actividad de Ap, estableciéndose así un bucle de regulación negativa que es importante para restringir temporalmente la actividad de Ap y controlar su estabilidad (Milán y Cohen, 1999b; Milán y Cohen, 2000; Weihe y cols., 2001). Sin embargo, en vertebrados, LMO y LDB también pueden formar complejos activadores de la transcripción junto con factores GATA y bHLH, entre otros (revisado en Bach, 2000).



El tetrámero funcional descrito hasta ahora se une al ADN por medio de los HD de los factores LIM-HD y se ensambla gracias a la dimerización de LDB. Ni LDB ni la mayoría de los factores LIM-HD poseen dominios de trans-activación y, sin embargo, estos complejos se consideran activadores de la transcripción (Hobert y Westphal, 2000; Hunter y Rhodes, 2005). La capacidad activadora de la transcripción parece conferirle la proteína Sequencespecific single-strand DNA-binding protein (Ssdp) (Bayarsaihan y cols., 1998), que tiene un dominio de trans-activación rico en Prolina (Nishioka y cols., 2005). Ssdp se incorpora al complejo 2LIM-HD•2LDB a través de una región específica en LDB (LDB/Chip conserved domain, LCCD) que se localiza en el dominio de dimerización (Fig. I10.A). La función de Ssdp en este complejo (ahora hexamérico) se describió inicialmente para el complejo de Ap/Chip en el ala de *Drosophila* y el de Xlim-1/Ldb1 en el organizador de Spemann (Chen y cols., 2002; van Meyel y cols., 2003).

Los LIM-HD del grupo *islet*

Genes homólogos a *tailup/islet* se han encontrado en todos los metazoos bilaterales, desde nematodos hasta vertebrados, si bien sus funciones sólo se han estudiado en *Drosophila*, mamíferos y peces (Hobert y Westphal, 2000). Se han descrito tres funciones principales de Isl-1 y su parólogo Isl-2 en vertebrados. Como prácticamente todos los factores LIM-HD, Isl-1 e Isl-2 participan en la diferenciación neuronal. *isl-1* se requiere en mamíferos para la formación de motoneuronas (Pfaff y cols., 1996), y tanto *isl-1* como *isl-2* son necesarios para la subsiguiente especificación del subtipo visceral de motoneuronas de la espina dorsal (Thaler y cols., 2004). Tanto en el ratón como en el pez cebra, *isl-2* regula la diferenciación de neuronas sensoriales, condicionando su migración axonal (Pak y cols., 2004; Segawa y cols., 2001). Por otro lado, *isl-1* se expresa en una región dorsal del páncreas en desarrollo, y en su ausencia esta región no se forma ni tampoco se diferencian las células endocrinas pancreáticas (Ahlgren y cols., 1997). Terminado el desarrollo del páncreas Isl-1 actúa como activador de la transcripción de insulina, el glucagón y la amylin (Karlsson y cols., 1990; Wang y Drucker, 1995; Wang y Drucker, 1996). En los últimos años, se ha descrito el requerimiento de *isl-1* para el desarrollo del segundo campo morfogénico del corazón de mamíferos (second heart field, SHF), del que derivan la mayor parte de las estructuras cardíacas. Los embriones mutantes *isl-1* carecen de estas estructuras (Cai y cols., 2003). Isl-1 es el único factor que se ha detectado en todo el SHF, y se ha propuesto que de él dependen los factores que subdividen este primordio (Black, 2007). El análisis del linaje de las células que expresan *isl-1* en el SHF ha permitido averiguar que existen células embrionarias multipotentes capaces de producir células de músculo cardíaco, de músculo liso y endoteliales (Moretti y cols., 2006); en el adulto permanecen células progenitoras que expresan *isl-1* y son susceptibles de cultivarse y diferenciar en músculo cardíaco (Laugwitz y cols., 2005). También se ha encontrado una función en el establecimiento del patrón dental murino, contexto en el que la expresión de *isl-1* y la de *BMP4* son interdependientes (Mitsiadis y cols., 2003).

En *Drosophila*, *tup* está involucrado en la diferenciación terminal de motoneuronas e interneuronas en el sistema nervioso del embrión y participa en el código combinatorial de factores LIM-HD (Thor y cols., 1999; Thor y Thomas, 1997). La función de *tup* es necesaria en el vaso dorsal embrionario, órgano análogo del corazón de vertebrados, que en mutantes *tup* presenta un crecimiento y estructuración alterados (Tao y cols., 2007). Los mutantes *tup* también desarrollan incorrectamente la amnioserosa (Frank y Rushlow, 1996), tejido en el que *tup* se expresa por efecto de la señalización de Dpp en el ectodermo dorsal (Ashe y cols., 2000).

tup también afecta el desarrollo del patrón de macroquetas de las regiones dorsocentral (DC) y escutelar (SC) (Biryukova y Heitzler, 2005). El funcionamiento

del regulador-cis del grupo proneural DC es el mejor conocido de todo el C-AS (Fig. I11.A). Tiene como activador principal a *pnr*, que codifica un factor GATA que se une directamente a varias secuencias del regulador DC (García-García y cols., 1999) (Fig. I11.B). En la región proximal del dominio de expresión de *pnr* también se encuentra el factor Ush, de la familia FOG (Friend of GATA), que puede formar un dímero represor con Pnr (Haenlin y cols., 1997) que restringe proximalmente la actividad del regulador DC (García-García y cols., 1999). La señalización de Wg se requiere,

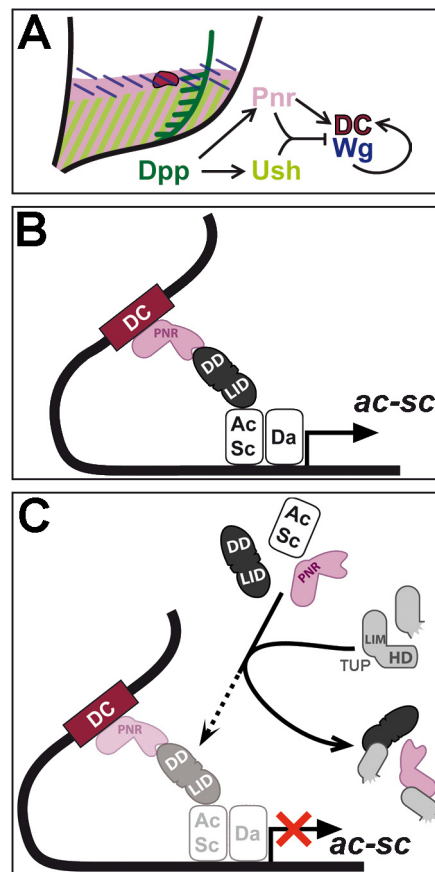


Figura I11. Función propuesta para *tup* en el desarrollo de las quetas dorsocentrales. (A) Factores que controlan la actividad del regulador-cis DC. La señalización de Dpp activa a *pnr* y a *ush*, de modo que el dominio de *ush* queda comprendido dentro del de *pnr*. Pnr, por sí mismo, es un activador del regulador DC, pero unido a Ush forma un dímero represor de este regulador. De este modo el regulador DC sólo se activa dentro de la franja del dominio de *pnr* libre de Ush. El efecto sobre *wg* es similar, y éste a su vez es un factor permisivo en la actividad del regulador DC. (B) Según Romain, Heitzler y cols., la comunicación del regulador DC con los promotores del C-AS se produce mediante un puente físico establecido por Chip entre Pnr (unido al ADN del regulador DC) y los dímeros Ac/Sc•Da (unidos al promotor). (C) Una de las funciones de Tup consiste en impedir que se forme el puente entre el regulador DC y los promotores del C-AS, compitiendo por Pnr (con el ADN) y por Chip (con Ac/Sc).

como factor permisivo, para la actividad del regulador DC (García-García y cols., 1999). En las células en que Pnr activa el regulador DC, Chip facilita la comunicación entre el regulador y los promotores del C-AS. Para ello Chip, en forma monomérica, interacciona físicamente con Pnr (a través del DD) y con un miembro de los dímeros Ac/Sc•Da (a través de un subdominio del LID), estableciendo un puente entre ellos (Romain y cols., 2000) (Fig. I11.B). Chip compete con Ap, con la proteína del grupo *trithorax* Osa, y con otras moléculas de Chip para heterodimerizar con Pnr (Heitzler y cols., 2003; Romain y cols., 2000). En cambio, los reguladores de la cromatina Toutatis e Iswi facilitarían la interacción entre Pnr y Chip (Vanolst y cols., 2005). En este contexto, se ha propuesto un modelo por el cual Tup actuaría, a través de interacciones

proteína-proteína exclusivamente, como un inhibidor de la actividad del regulador DC (Biryukova y Heitzler, 2005). Los dominios LIM de Tup permitirían la unión física, además de al LID de Chip, a los dedos de zinc de Pnr, por lo que Tup establecería una doble competición con los bHLH proneurales, por Chip, y con las cajas GATA del regulador DC, por Pnr (Fig. I11.C).

objetivos

'¿Qué de portentosos descubrimientos voy a hacer! ¡Excelsa será mi gloria! Ante los presentes y venideros, asombrados de mis soberanas conquistas, pasaré sin duda por genio extraordinario, por un demonio del análisis, por un monstruo de penetración, de intuición y de lógica...'

Santiago Ramón y Cajal (1941). *El pesimista corregido*

Nuestro interés científico se ha centrado en encontrar las claves genéticas que distinguen el territorio presuntivo de notum en el disco dorsal mesotorácico, frente a los de la articulación y la hoja del ala. Esta distinción depende de la señalización del EGFR, que promueve el crecimiento del tejido y activa la expresión de los genes del C-Iro (Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b). Los miembros del C-Iro confieren identidad de notum a las células de la región proximal del disco (Diez del Corral y cols., 1999). Por otro lado, la actividad de Dpp y de *msh* restringen el dominio de expresión de los genes del C-Iro y por tanto del territorio de notum (Cavodeassi y cols., 2002; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Sin embargo, la expresión ectópica de los genes del C-Iro no es suficiente para imponer la identidad de notum a otros tejidos (Diez del Corral, 1998), por lo que es presumible que existan otros genes involucrados en este proceso.

Trabajos previos indicaron que durante el tercer estadio larvario temprano *tailup* (*tup*) se expresa en el disco de ala exclusivamente en el primordio de notum (Butler y cols., 2003; María Jesús García-García, no publicado). Por tanto, *tup* era un buen candidato a ejercer alguna función en la especificación del notum, y así los objetivos de esta tesis fueron:

- **1** Analizar el patrón de expresión de *tup* en el territorio de notum durante el desarrollo larvario. Determinar si éste era compatible con una función en la especificación del notum.
- **2** Caracterizar los alelos mutantes *tup*¹, *tup*² y *tup*^{isl-1}. Escoger entre estos, u otros generados ex profeso, uno adecuado para analizar genéticamente la función de *tup*.
- **3** Analizar los fenotipos de falta de función de *tup* en el notum.
- **4** Analizar la regulación de la expresión de *tup* en el notum.
- **5** Vista la implicación de *tup* en la especificación del notum, comparar la capacidad de *tup*, del miembro del C-Iro *araucan*, o de ambos de inducir, mediante sobreexpresión, el desarrollo de tejido de notum en otras regiones del cuerpo de *Drosophila*.

resultados

'...But things turned out as they were bound to do and not as I had expected...'

Hans Driesch (1907) *The Science and Philosophy of the Organism*

R1 Descripción molecular de los alelos *tup*

Para realizar el análisis funcional de *tailup* utilicé los alelos *tup*¹, *tup*², *tup*^{isl-1}, *tup*^{d03613} y *tup*^{ex4}, además de la construcción *UAS-tup*^{IR}. En primer lugar caractericé molecularmente las lesiones en los alelos preexistentes *tup*¹, *tup*², *tup*^{isl-1} y *tup*^{d03613}. La Fig. R1 muestra la localización de las distintas mutaciones en la región genómica de *tup*, y la naturaleza de cada una de ellas se especifica en la Tabla R1 (ver detalles en M2-5). En *tup*¹, la sustitución C57Y afecta a la cisteína que constituye el cuarto ligando metálico del primer dedo de zinc de la proteína (Michelsen y cols., 1994). En *tup*^{isl-1} y *tup*² se producen mutaciones en sitios aceptores de ajuste, en los residuos de guanósina en los que terminan los intrones primero y segundo, respectivamente. Estas guanósinas están absolutamente conservadas en los intrones de los pre-ARNm de levaduras y mamíferos (Burge y cols., 1999; Moore y cols., 1993; Senapathy y cols., 1990) e intervienen en el segundo paso catalítico del ajuste (revisado en Umen y Guthrie, 1995). Como consecuencia, el procesamiento del pre-ARNm de *tup* en estos mutantes produce una o dos especies (en *tup*² o *tup*^{isl-1}, respectivamente) de ARNm en las que se emplean sitios aceptores crípticos o del intrón siguiente. Estas especies codificarían proteínas truncadas. Sorprendentemente, también encontré en

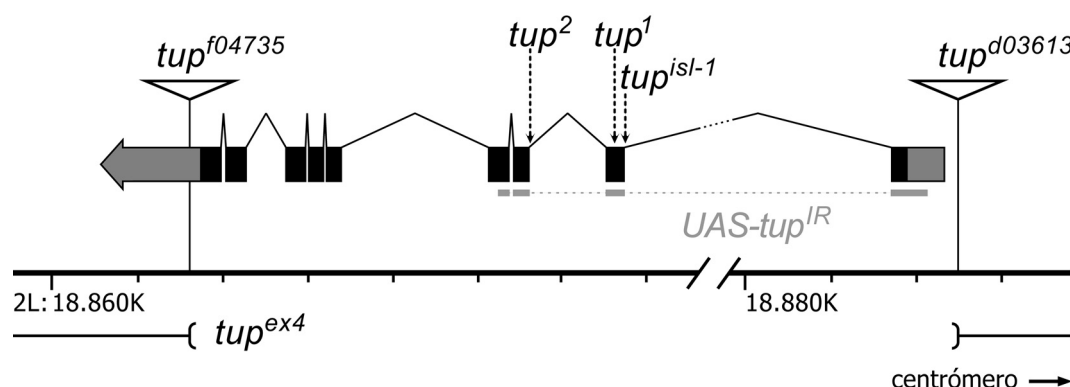


Figura R1. Región genómica de *tup*. Mapa de la región genómica de *tup*, con la localización de las mutaciones. Las cajas anchas representan los exones de *tup* (en negro, la región codificante, y en gris oscuro, las regiones no traducidas). La orientación de la unidad de transcripción y la numeración de la posiciones corresponden a la versión 5.1 de la anotación del genoma. Las cajas finas en gris claro representan la zona utilizada para producir el transgén *UAS-tup*^{IR}. La representación de los exones corresponde al transcrito *tup*-RA (U89385; Flybase ID FBtr0081111). El otro transcrito, *tup*-RB (AF145674; Flybase ID FBtr0081112), tiene el octavo exón un poco más largo y carece del noveno; su región codificante es algo más corta.

Tabla R1. Relación de los alelos *tup* y su naturaleza molecular.

Alelo	Sinónimos	Lesión	Clase
<i>tup^{d03613}</i>	-	Inserción de un elemento P{XP}, que incluye secuencias UAS, en posición -171 b respecto del inicio de transcripción descrito para <i>tup</i> .	Hipomorfo ¹ (fuerte) ² . Línea UAS ³ .
<i>tup¹</i>	<i>tup^{III E29}</i>	Cambio G→A en la posición +31 del segundo intrón. Se produce la sustitución de una cisteína, involucrada en la unión a Zn ²⁺ , por una tirosina (C57Y) en el primer dominio LIM.	Genéticamente nulo ^{1,2,4} .
<i>tup²</i>	<i>tup^{III E16}</i>	Cambio G→A en posición -1 del sitio aceptor de ajuste del segundo intrón. El ajuste del pre-ARNm se produce en la posición +1 (lo que daría una proteína no funcional) y en el lugar correcto.	Genéticamente nulo ^{1,2} .
<i>tup^{isl-1}</i>	<i>l(2)E41</i> <i>l(2)37Aa</i> <i>isl¹</i>	Cambio G→A en posición -1 del sitio aceptor de ajuste del primer intrón. El ajuste del pre-ARNm se produce en la posición +41 o en el sitio aceptor del segundo intrón (lo que daría proteínas no funcionales) y en el lugar correcto.	Genéticamente nulo ^{1,2} .
<i>tup^{ex4}</i>	-	Delección de 20 865 b en el intervalo 18 860 552-18 881 417 del brazo 2L (versión 5.1 de la anotación del genoma). Elimina desde 171 b antes del inicio de la unidad de transcripción hasta la posición 362 del noveno intrón (<i>tup-RA</i>), lo que abarca toda la zona codificante. En el punto de la delección permanece un elemento híbrido WH-XP.	Nulo ² .
<i>tup^{IQ3}</i>	-	Transposición dirigida del elemento P{XP} en <i>tup^{d03613}</i> , por un elemento P{GawB}.	Hipomorfo/neomorfo ² . Línea Gal4 ² .
<i>UAS-tup^{IR}</i>	-	Transgén de ARN interferente contra <i>tup</i> (fragmento 96-906 del ADNc AF145674).	Condicional ² .

Referencias: ¹ Biryukova y Heitzler, 2005; ² esta tesis; ³ Flybase ID FBti0042800; ⁴ Goldman-Levi y cols. 1996.

ambos casos una fracción de mensajero procesado correctamente. El mutante *tup^{d03613}* tiene un transposón P{XP} (Thibault y cols., 2004) insertado 171 b antes del inicio de transcripción de *tup*. La delección *tup^{ex4}* elimina 20 865 b de ADN genómico entre los puntos de inserción de *tup^{d03613}* y de *tup^{f04735}*, lo que incluye toda la zona codificante del gen. (*tup^{f04735}* es una inserción PBac{WH} en el nucleótido 362 del último exón y no tiene fenotipo observable.) En el empalme de esta delección permanecen secuencias de ambos transposones. Además, obtuve la inserción *tup^{IQ3}* por intercambio entre el elemento inserto en *tup^{d03613}* y una inserción P{GawB} en presencia de transposasa, que expresa el gen de levaduras *Gal4* en parte del patrón de expresión de *tup* (ver sección M5 y Fig. R3.E).

Los alelos *tup¹*, *tup²*, *tup^{isl-1}* y *tup^{ex4}* son letales embrionarios y son genéticamente nulos (Goldman-Levi y cols., 1996, y mis observaciones). Sin embargo los alelos *tup²* y *tup^{isl-1}* no pueden considerarse en sentido estricto nulos moleculares. Por otro lado, en *tup¹* está afectado un ligando de zinc del primer dedo del primer dominio LIM; Rincón-Limas y cols. (2000) encontraron que una proteína Ap mutante simultáneamente para cuatro ligandos de zinc en el primer dominio LIM puede rescatar parcialmente la falta de función de *ap*, lo que coincide con el hecho de que un solo dominio LIM puede unirse al LID de LDB, si bien se ha propuesto que la unión de dominios LIM en tándem es cooperativa (Deane y cols., 2004). Esto sugiere que *tup¹*, por analogía, aún podría retener cierta actividad. *tup^{d03613}* es un alelo semiviable hipomorfo (Biryukova y Heitzler, 2005, y mis observaciones) que no complementa con *tup^{ex4}*.

R2 Expresión de *tup* en tejidos imaginales

En el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario, *tup* se expresa exclusivamente en la región presuntiva de notum (M. J. García-García, no publicado; Biryukova y Heitzler, 2005; Butler y cols., 2003). No se ha descrito la expresión en otros tejidos imaginales ni en estadios anteriores del desarrollo larvario, así que estudié con más detalle el patrón de expresión de *tup* mediante hibridación in situ e inmunodetección.

Encontré expresión de *tup* en el disco de ala desde el segundo estadio temprano

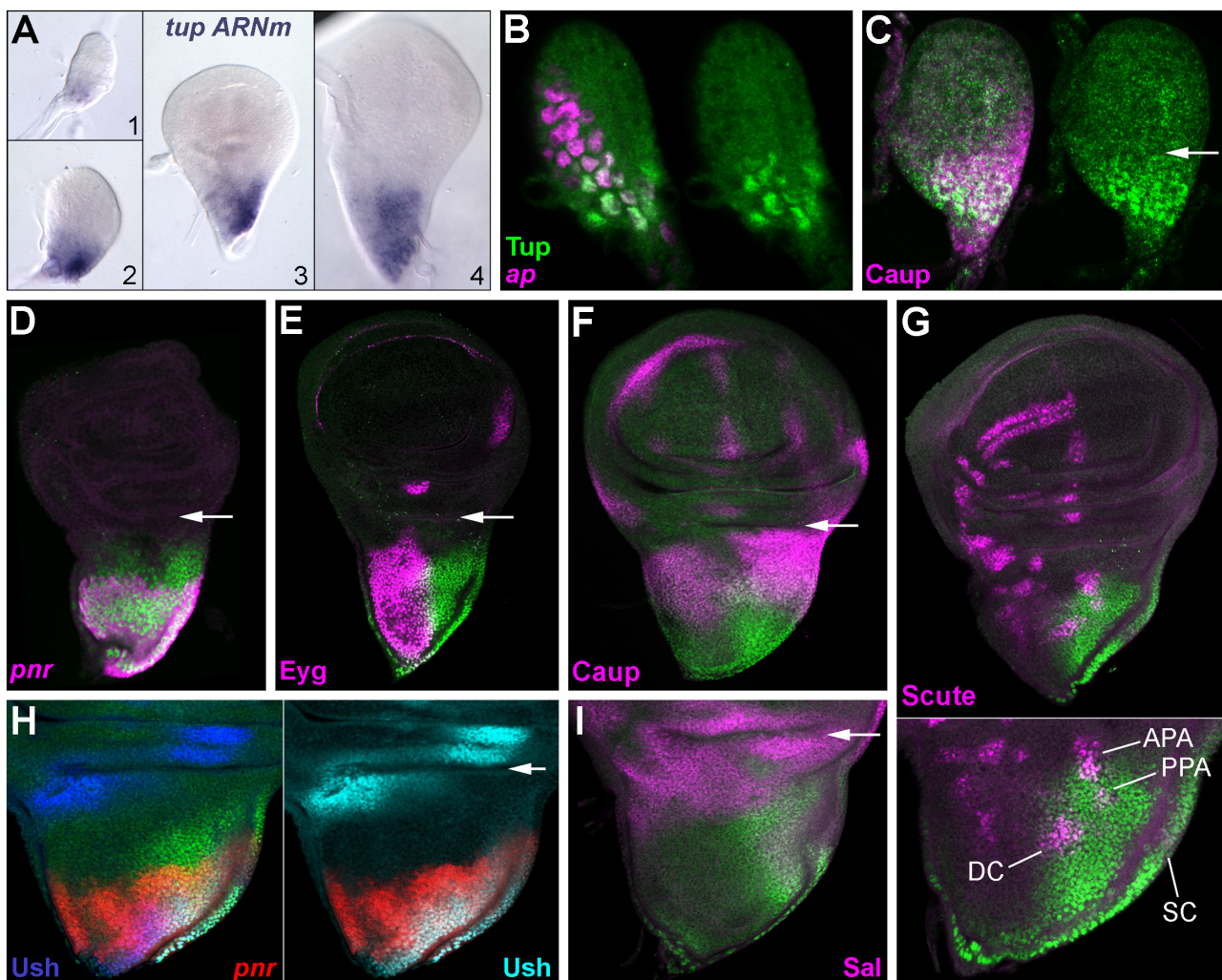


Figura R2. Análisis del patrón de expresión de *tup* (I). En esta y las figuras restantes los discos se dispondrán, salvo indicación explícita, con la parte anterior a la izquierda y la ventral arriba. (A) Evolución del patrón de transcripción de *tup* en discos imaginales de ala/notum. 1, disco de segundo estadio larvario. 2, tercer estadio temprano. 3, tercer estadio medio. 4, tercer estadio avanzado. La parte posterior del notum acumula más ARNm de *tup* durante el tercer estadio. (B) Disco de segundo estadio temprano. En verde (en todos los paneles), *Tup*. En morado, *ap-lacZ* marca el compartimento dorsal. (C) Disco de segundo estadio tardío. La expresión de *ara/caup* (en morado, detectada con anti-*Caup*, que reconoce tanto a *Ara* como a *Caup*) marca el territorio de notum. *tup* se expresa en casi todo el notum presuntivo, sin llegar al borde notum/axila (flecha en todos los paneles). (D) Disco de tercer estadio medio. La expresión de *pnr* (visualizada con *pnr^{MD237} UAS-lacZ* en todas las figuras) (morado) marca el notum medial. El dominio de expresión de *tup* se extiende por el notum distal. (E) Disco de tercer estadio avanzado. En morado, *ap-lacZ* marca el territorio correspondiente al scutum salvo la parte más lateral. (F) En el tercer estadio avanzado, *Tup* y *Caup* (morado) ya sólo colocalizan en una franja lateral y posterior. (G) En el tercer estadio avanzado, *Tup* solapa con los grupos proneurales DC, SC, PPA y APA (marcados con *Sc*, morado). (H) Los patrones de expresión tardía de *tup*, *ush* (azul) y *pnr* (rojo) solapan sólo parcialmente. (I) *tup* no se expresa tardíamente en la región más lateral del notum (marcada con *Sal*, morado).

(Fig. R2.A-C). Marcando el compartimento dorsal mediante la expresión de *ap* o bien el primordio de notum mediante la de *ara/caup*, comprobé que esta expresión temprana de *tup* se restringe a la parte proximal del disco, lo que incluiría el primordio de notum al menos parcialmente (Fig. R2.B-C). No conseguí averiguar si esta expresión comienza en el primer periodo larvario, pero sí que no se hereda del embrión, puesto que *Tup* no se detecta en los primordios embrionarios de los discos imaginales (Fig. S1).

En larvas de tercer estadio medio, por comparación con la expresión de *pnr* (Fig. R2.D), el dominio de expresión de *tup* abarca toda la región medial y parte de la lateral del notum presuntivo. Ya en discos de tercer estadio avanzado, la expresión de *tup* en la zona anterior decae, de modo que su dominio forma un triángulo en la región posterior del territorio de notum. Los bordes distal y anterior del dominio de expresión forman un pequeño gradiente (Fig. R2.A,D-I, comparar con B-C). En este momento, la expresión distal de *tup* llega hasta la región próximo-lateral, por comparación con la expresión de *eyg* o *sal* (Fig. R2.E,I), y el límite anterior de expresión de *tup* acaba coincidiendo con el límite anterior del grupo proneural DC (Fig. R2.G). En la región anterior a este límite no se detecta acumulación de *Tup* en discos maduros de tercer estadio (R2.E-I), pero la persistencia de algunos fenotipos en esta región (ver más

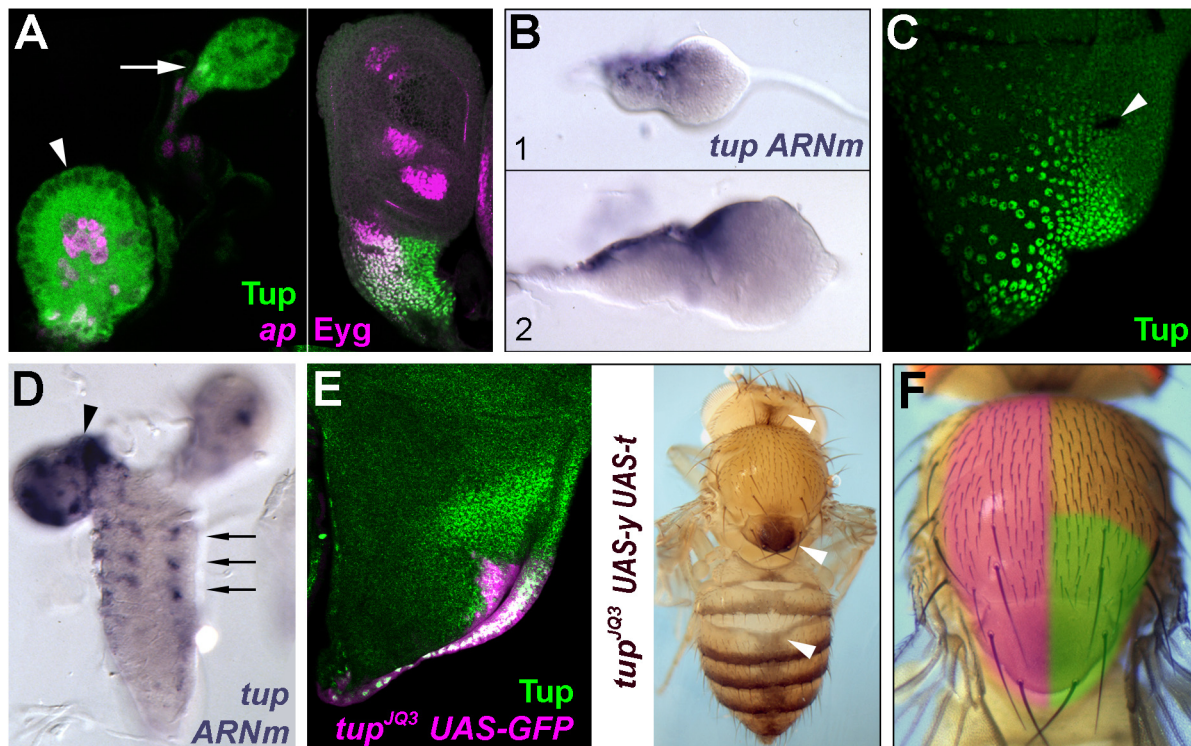


Figura R3. Análisis del patrón de expresión de *tup* (II). (A) Izquierda: discos de segundo estadio larvario de ala (punta de flecha), y halterio (flecha) que muestran expresión de *tup* (verde en todos los paneles) y *ap-lacZ* (morado). Derecha: disco de halterio de tercer estadio avanzado con expresión de *tup* y *eyg* (morado). (B) Patrón del ARNm de *tup* en discos de ojo de segundo estadio (1) y tercer estadio temprano (2). *tup* se expresa en la región dorsal. (C) Expresión de *tup* en la membrana peripodial del disco de ala/notum en tercer estadio. (D) Patrón del ARNm en el cerebro larvario (la parte anterior hacia arriba). Hay un patrón de expresión segmental (flechas). La tinción del lóbulo óptico izquierdo es artefactual (punta de flecha). (E) Izquierda: expresión de *UAS-GFP* dirigida por la línea *tup*^{JQ3} (morado) en el tercer estadio, y comparada con la expresión de *tup*. Derecha: expresión de la línea *tup*^{JQ3}, visualizada con *UAS-y+UAS-t* en el adulto (puntas de flecha). En esta y las demás figuras, los adultos se dispondrán, salvo indicación explícita, con la parte anterior hacia arriba. (F) Regiones adultas que derivan del territorio que expresa *tup* en el tercer estadio (verde, derecha) y en el segundo (morado, izquierda). El límite distal de expresión es aproximado. Imagen original cedida por Juan Modolell.

adelante) sugiere que aún queda una expresión débil de *tup*. La expresión fuerte de *tup* coexiste en distintas zonas con las de *ara/caup*, *ush*, *pnr* y *sal* (Fig. R2.F,H-I), y solapa con la de *sc* en los grupos proneurales DC, SC, APA y PPA (Fig. R2.G). Intenté reflejar el patrón de expresión de *tup* en adulto mediante la obtención de una línea *tup-Gal4* por conversión de la inserción *tup^{d03613}* mediante transposición dirigida (ver Materiales y métodos), pero la expresión que dirige la línea obtenida, *tup^{IQ3}*, refleja sólo una parte del dominio de expresión de *tup* (Fig. R3.E). La Fig. R3.F es una representación en el adulto de los límites de la expresión de *tup* en el tercer estadio larvario.

tup se expresa también en otros tejidos larvarios. En el disco de halterio se encuentra una región de expresión equivalente a la del disco de ala desde el segundo estadio (Fig. R3.A), aunque no se observa la retirada de expresión de la parte anterior. En el disco de ojo-antena, *tup* se expresa en un territorio que corresponde aproximadamente a la cápsula cefálica dorsal, también desde el segundo estadio (Fig. R3.B). La membrana peripodial de los discos de ala (en la parte proximal, Fig. R3.C) y de ojo-antena (en la parte dorsal, datos no mostrados) también expresan *tup*, así como el ganglio ventral del cerebro larvario (Fig. R3.D).

Debido a que *tup* codifica un factor LIM-HD, quise averiguar si otros factores nucleares, de la misma familia o de tipo LMO, se expresaban en dominios solapantes. Aparte de los casos conocidos de *ap* y *Bx*, realicé hibridaciones in situ para determinar la expresión imaginal de otros genes de este tipo que se hubieran descrito en *D. melanogaster* (*lim1*, *lim3*, *Arrowhead*) o predicho en la anotación de su genoma (CG4328, CG10432). Aparte de *Ap* y *dLMO*, en el territorio de notum no parece haber otros factores LIM nucleares que pudieran dificultar el análisis de la función de *Tup*, al menos en tercer estadio (Fig. S2).

También quise averiguar cuántos transcritos de *tup* podían encontrarse a lo largo del desarrollo, para lo que preparé un Northern Blot con ARN de diferentes estadios (Fig. S3). Parece haber siete transcritos diferentes, algunos de menor tamaño que las fases abiertas de lectura encontradas para *tup* (1,4 y 1,6 kb, respectivamente, en (Stapleton y cols., 2002 -AF145674- y Thor y Thomas, 1997 -U89385-). De los transcritos mayores, el predominante durante el periodo larvario parece ser el que coincide por tamaño con los ADNc descritos (3,4 kb).

R3 *tup* es necesario para la especificación del notum, la integridad epitelial y el cierre dorsal adulto

Estudí el fenotipo de falta de función de *tup* en la cutícula adulta mediante el análisis de clones de recombinación mitótica con los alelos *tup¹*, *tup²*, *tup^{isl-1}* y *tup^{ex4}*, cuyos resultados fueron equivalentes, y mediante sobreexpresión del transgén *UAS-tup^{IR}* (ver Materiales y métodos para los detalles).

R3-1 Fenotipos en la cutícula adulta

La pérdida de función de *tup* produjo defectos en la cutícula de la cápsula cefálica dorsal, del mesonotum, metanotum, y los terguitos abdominales. Los efectos más severos se observaron en clones de recombinación mitótica en el notum, donde

Tabla R2. Análisis cuantitativo^(a) de los fenotipos asociados a los clones *tup^{ex4}*.

	Momento de inducción ^(b) (horas DDH)	Subregión del notum [‡]			
		Scutum anterior	Scutum posterior	Notum lateral	Escutelo y postnotum
Número de clones examinados	24-48	83	11	15	15
	48-72	96	65	51	52
	72-96	522	335	156	273
Clones gemelos sin clon mutante	24-48	57 (63)	7 (64)	NC	10 (67)
	48-72	17 (18)	10 (15)	NC	13 (25)
	72-96	NC	NC	NC	NC
Clones sin fenotipo	24-48	17 (20)	1 (10)	10 (67)	NC
	48-72	69 (72)	13 (20)	29 (57)	2 (4)
	72-96	495 (95)	146 (44)	76 (49)	13 (5)
Esferas de cutícula dentro del notum	24-48	0	0	0	0
	48-72	0	8 (12)	*	5 (10)
	72-96	3 (<1)	57 (17)	*	34 (12)
Lesiones de cutícula con órganos sensoriales típicos de la axila	24-48	2 (2)	2 (18)	3 (20)	2 (13)
	48-72	1 (1)	23 (35)	10 (20)	13 (25)
	72-96	3 (<1)	76 (23)	16 (10)	65 (24)
Tégulas ectópicas	24-48	6/16 (38) [§]	0	0	0
	48-72	6/39 (15) [§]	0	0	0
	72-96	0	0	0	0
Clones que afectan a las microquetas ^(c)	24-48	0	0	0	0
	48-72	2 (2)	1 (2)	0	0
	72-96	11 (2)	5 (1)	0	0
Clones que afectan a las macroquetas ^(d)	24-48	6 (7)	1 (10)	2 (13)	3 (20)
	48-72	11 (11)	10 (15)	12 (24)	19 (37)
	72-96	10 (2)	51 (15)	64 (41)	161 (59)

‡ - Esquema de las regiones del notum consideradas para contabilizar los fenotipos

a - Las cifras indican el número de clones que presentan el fenotipo correspondiente, y entre paréntesis el porcentaje que supone sobre el número total de clones.

b - Los clones se indujeron por tratamiento a 37°C durante 30 min, y se reconocieron por el marcador *yellow*. Los clones gemelos se marcaron con *ck¹³*.

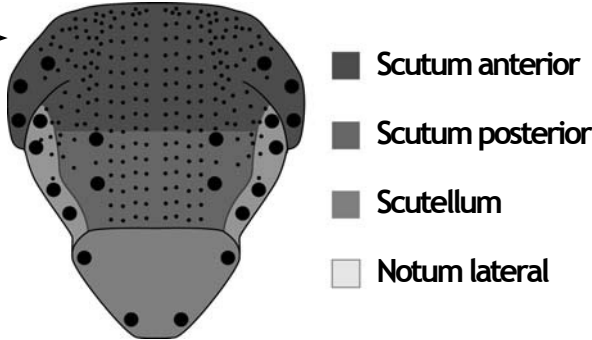
c - Los defectos observados en las microquetas consistieron en parches con mayor densidad de órganos, quetas con la orientación del pelo invertida, y grandes remolinos de microquetas tanto formados por órganos *tup^{ex4}* y silvestres.

d - Los efectos concretos sobre el patrón de macroquetas se detalla en la Tabla R4.

§ - Las tégulas ectópicas asociadas a clones inducidos por tratamiento a 37°C durante 30 min sólo aparecían en la región notopleural. Por tanto, los porcentajes se han calculado con respecto a los clones localizados en esta región.

* - Las esferas de cutícula también aparecían en la región lateral, pero en el conteo se adscribieron al scutum anterior o posterior.

NC - No contabilizado.



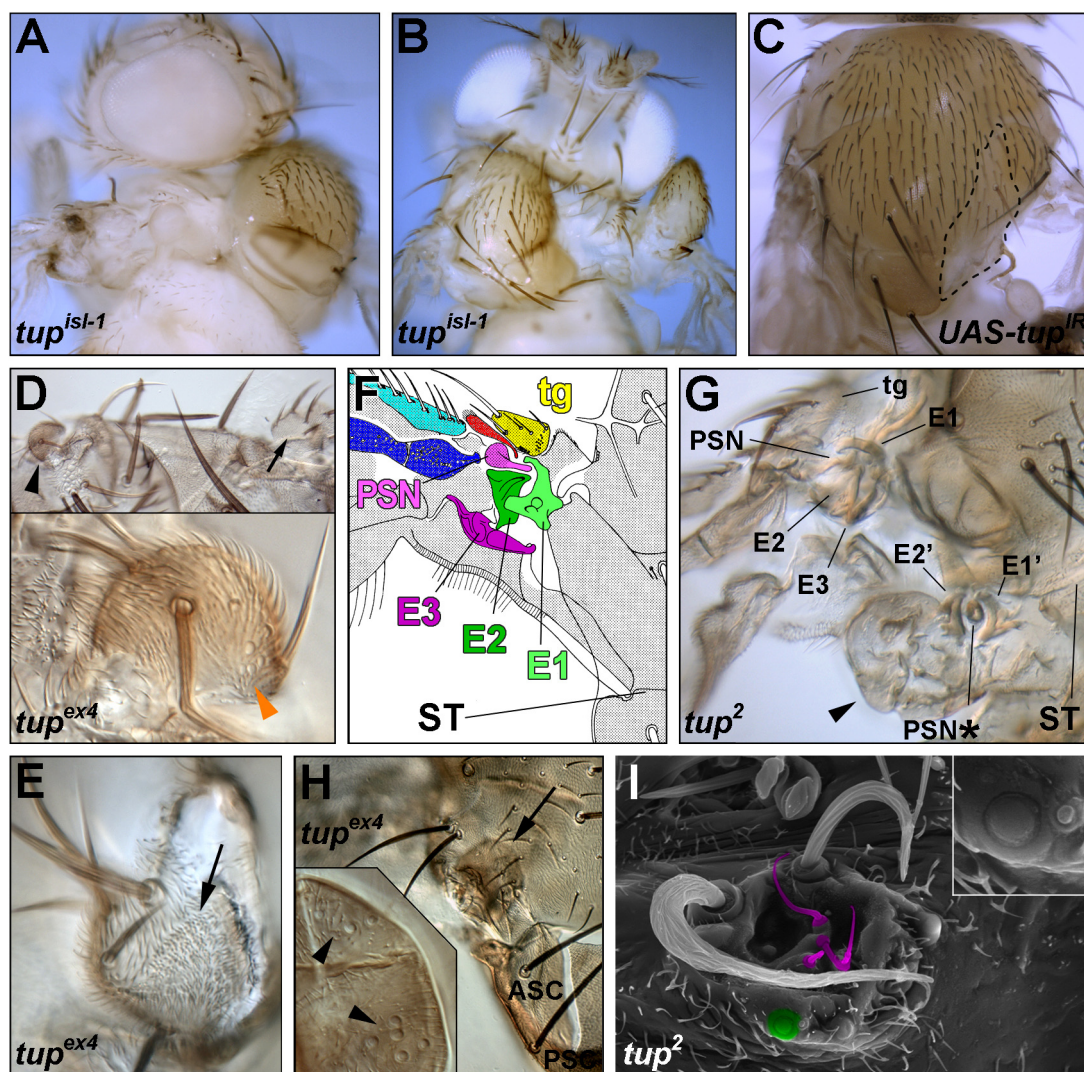


Figura R4. Fenotipos adultos asociados a la falta de *tup* (I). Alteraciones de la identidad de notum. (A) Mosca con clones y *tup^{isl-1}* inducidos en el primer estadio (24-48 h DDH), a la que falta un heminotum. (B) Mosca con clones y *tup^{isl-1}* (24-48 h DDH), a la que falta gran parte de un heminotum. Sólo permanece la región más lateral. (C) Mosca con un clon y *2xUAS-tup^{IR}* (*arm-Gal4:VP16*, 24-48 h DDH), que ha provocado la pérdida de tejido del escutelo. El contorno del clon se indica con la línea punteada. (D) Arriba, tégula ectópica (punta de flecha negra) formada por un clon y *tup^{ex4}* inducido en el segundo estadio (48-72 h DDH). Flecha: tégula silvestre. La parte anterior está a la izquierda. Abajo, detalle de la tégula ectópica en la que se ven sensilas campaniformes (flecha naranja) y un clon gemelo (marcado con *ck*) adyacente. (E) Tégula ectópica formada por un clon y *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) y por tejido del clon gemelo (*ck*, flecha). Las sensilas están fuera de foco. (F) Esquema de las estructuras dorsales de la axila. tg, tégula (amarillo). E1, E2 y E3, primer (verde claro), segundo (verde oscuro) y tercer (morado) esclerito axilar, respectivamente.

PSN, placa sin nombre (rosa). ST, sutura escuto-escutelar. Rojo, placa humeral. Azul, radio dorsal. Azul claro, costa proximal. Modificado de Bryant (1975). (G) Escleritos ectópicos en una protuberancia (punta de flecha) formada en el notum lateral de una mosca con clones *f tup²*. E1, E2, E3, tg, PSN y ST: ver F. E1' y E2', primer y segundo esclerito axilar ectópicos, respectivamente. PSN con asterisco: esclerotización entre E1' y E2', que podría corresponder a una PSN ectópica, malformada y mal orientada con respecto a E1'. (H) Vesícula (flecha) producida en una mosca con clones y *tup^{ex4}* (48-72 h DDH). La parte anterior está a la izquierda. En el recuadro, detalle de un plano focal interno, en el que se aprecia la presencia de sensilas campaniformes (puntas de flecha). (I) Lesión cuticular causada por un clon *f tup²* inducido al comienzo del tercer estadio (72-96 h DDH). Pueden verse sensilas tricoideas (coloreadas en morado) y una campaniforme (coloreada en verde). La malformación está adyacente a un clon gemelo (*ck*). En el recuadro, detalle de la sensila campaniforme.

los clones produjeron una batería de fenotipos cuya naturaleza y frecuencia de aparición dependieron del momento de inducción de los clones y la región del notum donde crecían. En los casos más extremos desaparecía tejido de notum o, en un notum completo, se encontraban clones gemelos en ausencia de los correspondientes clones mutantes. En los casos en que la supervivencia no estaba comprometida, podían aparecer ectópicamente estructuras propias de la axila alar, malformaciones del tejido de notum, modificaciones del patrón de macroquetas (que se describen en la sección R6) o incluso ningún efecto observable. En las Tablas R2 y R3 se detalla la frecuencia con que ocurrían los distintos defectos observados en diversas condiciones experimentales, y en la Fig. R5.H-I se representa respectivamente la distribución espacial y temporal de los defectos más destacables.

Las pérdidas de tejido, cuando no afectaron a todo el heminotum (Fig. R4.A), eliminaron preferentemente el tejido de la región proximal del notum (Fig. R4.B) o de la región escutelar (Fig. R4.C). Las estructuras ectópicas de axila consistieron en tégulas (Fig R4.D) o tégulas mal formadas (Fig. R4.E) y masas de tejido despigmentado y desnudo de tricomas en el que a veces se reconocían escleritos dorsales (Fig. R4.G). Las malformaciones de cutícula de notum incluían protrusiones (Fig. R5.E-F) e invaginaciones (Figs. R4.H-I y R5.A-B). Éstas formaban desde grandes vesículas en las que se desarrollaban sensilas propias de la axila (Fig. R4.H), vesículas de menor

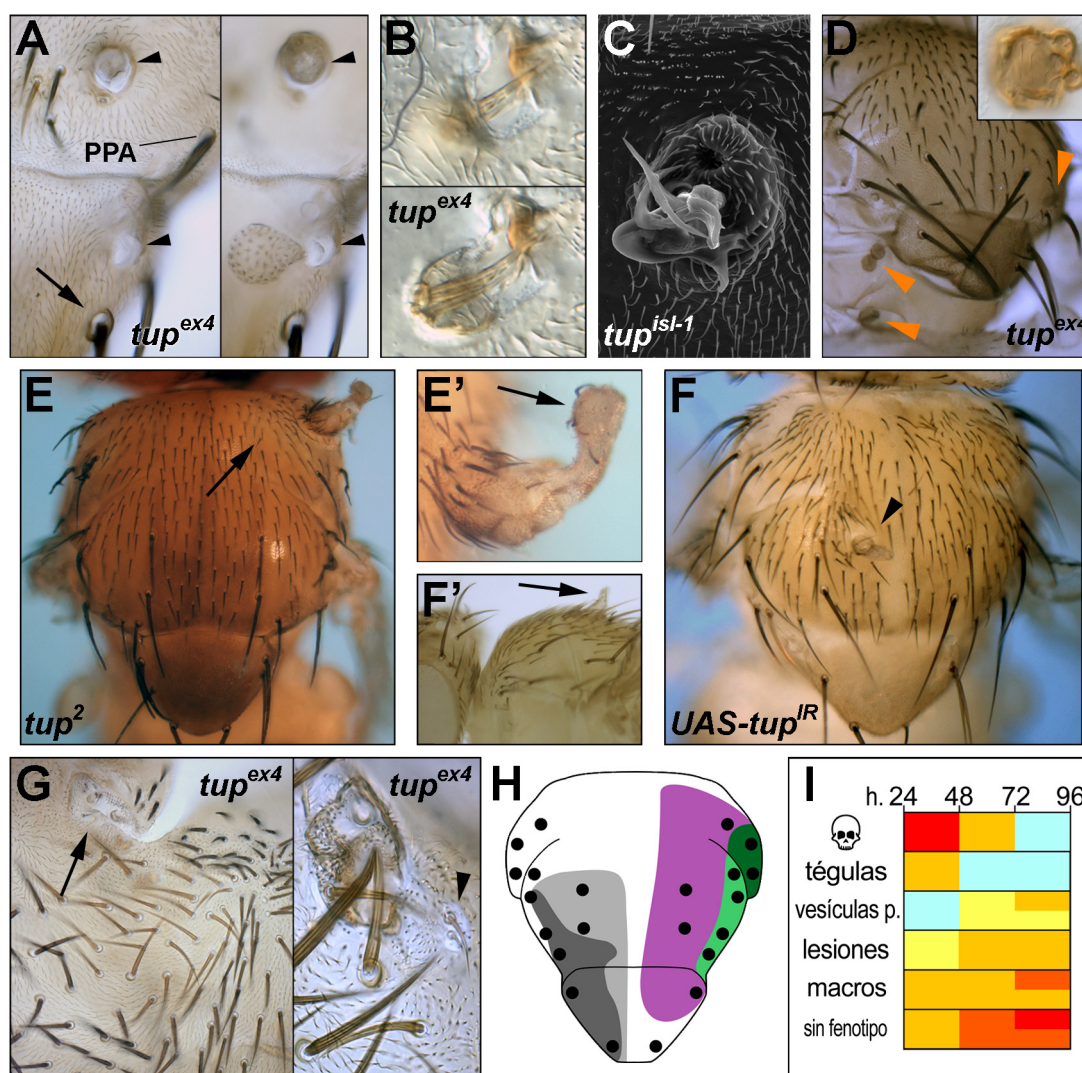


Figura R5. Fenotipos adultos asociados a la falta de *tup* (II). Alteraciones de la afinidad celular. (A) Vista de dos invaginaciones de cutícula de notum en una mosca con clones y *tup^{ex4}* (72-96 h DDH). La localización de la PPA permite situarse dentro del notum. Izquierda, plano focal superficial. Derecha, plano focal interno. Las puntas de flecha marcan la misma posición en las dos imágenes. La flecha apunta a una cerda SC extra. (B) Invaginación formada por un clon y *tup^{ex4}* (72-96 h DDH). Anterior izquierda. Arriba, plano focal superficial. Abajo, plano focal interno. La parte anterior está a la izquierda. (C) Corrugación de la cutícula del escutelo formada por un clon *f^{tup^{isl-1}}* (72-96 h DDH). El clon gemelo (ck) se distingue a la izquierda. (D) Vesículas de cutícula en el interior del notum de una mosca con clones y *tup^{ex4}* (72-96 h DDH, puntas de flecha). En el recuadro, detalle de una vesícula extraída de entre la musculatura torácica. El único elemento distinguible son algunos tricomas. (E) Protrusión producida por un clon *tup²* (72-96 h DDH, flecha). (E') Vista a mayor aumento de la protrusión en E. En la punta del crecimiento hay cerdas *f^{tup²}* (flecha), y

varias sensilas tricoideas eran distinguibles al microscopio. (F) Protrusión producida por un clon y *2xUAS-tup^{IR}* (*arm-Gal4:VP16*, 96-120 h DDH), que afecta a la orientación de las microquetas adyacentes. (F') Vista lateral de la excrecencia en F (flecha), donde se aprecia la elevación que alcanza. La parte anterior está a la izquierda. (G) Izquierda: clon y *tup^{ex4}* (48-72 h DDH) que produce un remolino de microquetas (mutantes y silvestres) alrededor de una lesión cuticular (flecha) que alberga sensilas tricoideas. Derecha: vista aumentada de una lesión similar a la del panel izquierdo, sin remolino, producida por un clon y *tup^{ex4}* (48-72 h DDH) y en la que se distinguen dos sensilas tricoideas (punta de flecha). (H) Esquema de la distribución espacial de los fenotipos más significativos obtenidos con *tup^{ex4}*, *tup^{isl-1}*, *tup²* y *tup¹*. Verde oscuro: formación de tégulas ectópicas. Verde claro: formación de grandes invaginaciones y sobrecrecimientos con sensilas, de tégulas ectópicas con menor frecuencia y ocasionalmente de escleritos. Morado: Aparición de corrugaciones y protrusiones en la cutícula susceptibles de presentar sensilas. Gris claro: formación, con baja frecuencia, de alteraciones cuticulares (vesículas sobre todo). Gris oscuro: formación, con alta frecuencia, de alteraciones cuticulares. (I) Esquema de la distribución temporal de algunos fenotipos, según aparezcan en clones *tup^{ex4}* inducidos en los intervalos indicados (datos de la Tabla R2). A 72-96 h se contabilizan los fenotipos en todo el notum (rectángulo inferior) o excluyendo el notum anterior según el esquema de la Tabla R2 (rectángulo superior). : aparición de clones gemelos sin el correspondiente clon mutante. tégulas: aparición de tégulas. vesículas p.: aparición de lesiones cuticulares sin sensilas asociadas (principalmente pequeñas vesículas). lesiones: aparición de alteraciones cuticulares susceptibles de albergar sensilas tricoideas o campaniformes. macros: clones que afectan al patrón de órganos sensoriales. sin fenotipo: aparición de clones mutantes sin fenotipo. Rojo: >50%. Naranja: 25-50%. Amarillo: 10-25%. Amarillo pálido: <10%. Azul pálido: =0%.

la R3. Abundancia relativa de otros fenotipo asociados a la falta de *tup*.

		Escleritos ectópicos	Tégulas malformadas no notopleurales	Microquetas en remolino ^(a)	Defectos cuticulares en el metatórax	Falta de heminotum	Protrusiones de cutícula	Falta de tejido (en el escutelo sobre todo)	Sutura scuto escutelar	Cierre torácico	Cierre cefálico	Fusión de terguitos	Fallos en la eversión
...a 37°C, 60 minutos ^(b,c)		R	R	↑	NC	↑↑	↑↑	↑↑	R	↑	×	R	↑↑
..con UAS <i>tup</i> , líneas <i>Gal4</i> ^(b) :	<i>MS248</i>	×	×	×	NC	×	×	↑↑	↑	↑↑↑	×	×	×
	<i>pnr</i> ^{MD237}	×	×	×	NC	×	×	↑↑	↑↑	↑↑	×	×	×
	<i>Ubx Gal4</i> ^{LDN}	NC	NC	NC	↑↑ ^s	NC	NC	NC	NC	NC	NC	↑↑	NC
con las líneas <i>Gal4</i> ^(c) :	<i>MS248</i>	×	×	×	NC	×	×	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	×
	<i>pnr</i> ^{MD237}	×	×	×	NC	×	×	↑↑	↑↑	↑↑↑	×	↑	×
	<i>tsh</i> ^{MD621}	×	×	×	NC	×	×	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	×	↑	×
	<i>dpp</i> ^{blk} <i>Gal4</i>	×	×	×	NC	×	×	R	↑	↑↑	×	NC	×
	<i>puc</i> ^{E69-1}	×	×	×	NC	×	×	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑	×
	<i>>y>Gal4</i> ^(e)	×	×	↑	NC	R	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	×	NC	×

da: R, observado rara pero reproduciblemente; ↑, infrecuente, pero no raro; ↑↑, frecuente; ↑↑↑, observado comúnmente en todos los individuos; ×, no observado.

os remolinos suelen albergar una lesión de cutícula con sensilas propias de la axila (ver R6-2 y Fig. R5.G).

nes *tup*¹, *tup*², *tup*^{isl-1} ó *tup*^{ex4}. Debido al alto número de clones en cada individuo, se ha estimado la abundancia fenotipo por la cantidad de individuos que lo presentan, y no por el número de clones que lo producen.

se ha tenido en cuenta la distribución temporal de los fenotipos, pero ésta es igual que la que se observa en la R1.

í fenotipos se obtuvieron por regla general con dos copias del transgén *UAS tup*^R. Utilizando una sola o cuatro, reducirse o aumentarse el fenotipo.

reexpresión en clones, bajo el control del promotor de *actina* o *armadillo* (ver M1).

o considerado.

os defectos consistían en malformaciones cuticulares que podían albergar sensilas propias del escabelo y el halo del halterio (ver R3-1 y Fig. R6.B-C).

tamaño (Fig R5.A-B), pequeñas verrugas con aberturas estrechas en el ápice (Fig R5.C) u oquedades amplias (Fig R4.I), hasta esferas de cutícula, totalmente desprendidas del notum, que quedaban insertas en la musculatura torácica (Fig R5.D). En estas malformaciones, la presencia de macro y/o microquetas (y en menor medida la pigmentación y la presencia parcial de tricomas) indicaba que el tejido constituyente mantenía la identidad de notum, aunque las mencionadas oquedades podían albergar sensilas tricoideas o, más raramente, campaniformes (en 14 de 80 oquedades), más propias de la axila alar. Estas oquedades, cuando se formaban en la región anterior del notum, producían a veces un remolino en las microquetas circundantes (que podían

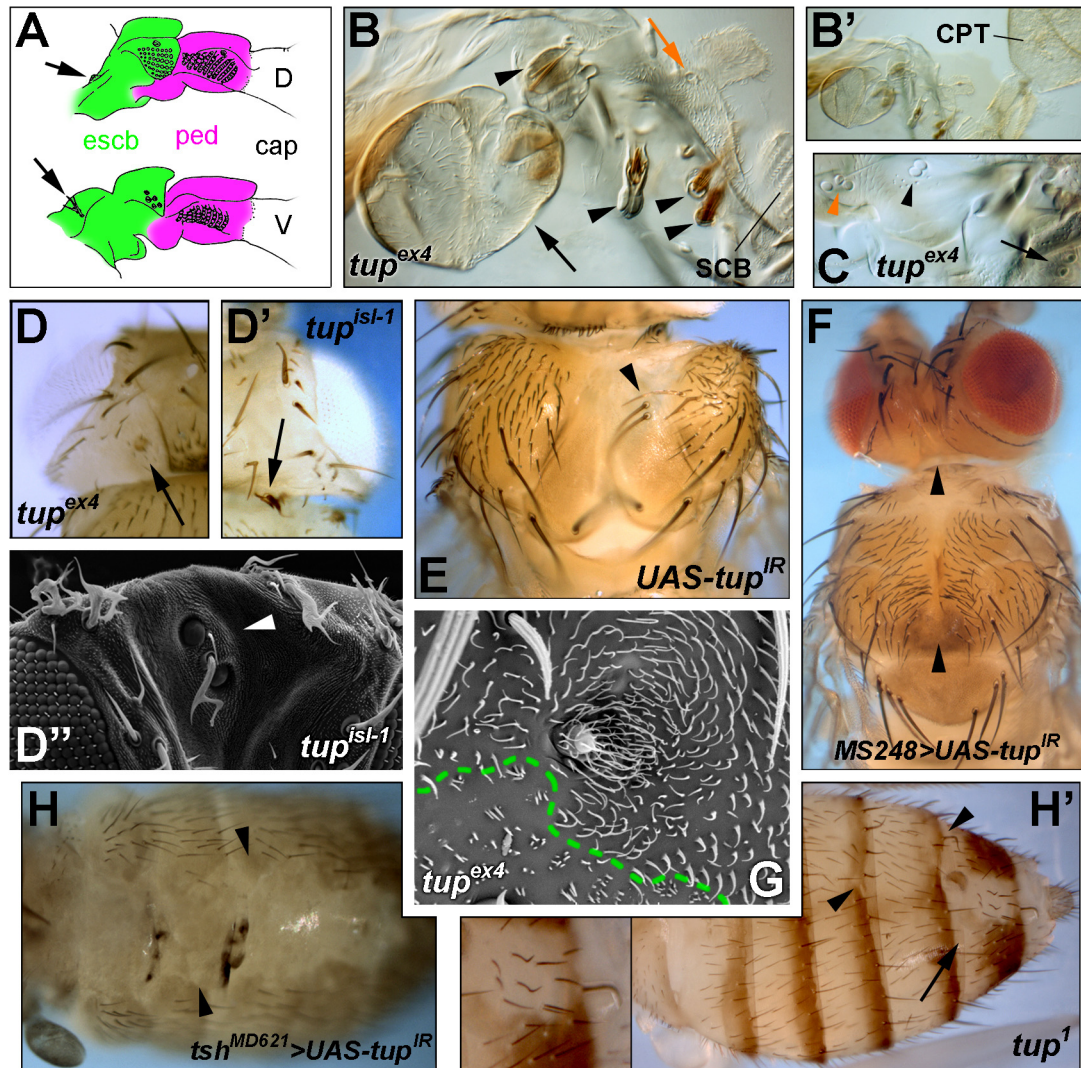


Figura R6. Otros fenotipos adultos asociados a la falta de *tup* (III). (A) Esquema de las sensilas proximales del metatórax, en el escabelo (escb, verde) y el pedicelo (ped, morado) en sus caras dorsal (D, arriba) y ventral (V, abajo). Las sensilas más proximales, las papilas mesotorácicas (flecha superior) y el grupo de cerdas ventral (flecha inferior) pertenecen al capitulo, y por tanto están fuera del metanotum. El capitulo (cap) queda a la derecha, y el metanotum a la izquierda. Modificado de Cole y Palka (1982). (B) Varios fenotipos que se producen en el metanotum induciendo clones *tup^{ex4}* (*Ubx-Gal4^{DN}* / *UAS-Flp*; los clones no están marcados). Hay vesículas que se invaginan y producen quetas ectópicas (puntas de flecha), grandes invaginaciones (flecha negra) y protuberancias (la flecha naranja apunta a la base de una, donde se aloja una sensila campaniforme). SCB, escabelo. (B') Vista del metatórax en B, con el campo ampliado, donde se aprecia el tamaño de la invaginación apuntada por la flecha negra por comparación con el capitulo (CPT). (C) Aparición de sensilas ectópicas (punta de flecha naranja) en el metanotum al inducir clones *tup^{ex4}* (*Ubx-Gal4^{DN}* / *UAS-Flp*; los clones no están marcados). Las papilas metatorácicas (punta de flecha) y el grupo de cerdas ventrales (flecha negra) están indicados. (D) Vesícula desprendida inserta en la cabeza de una mosca con clones y *tup^{ex4}* (48-72 h DDH). (D') Macroqueta ectópica en un clon *f tup^{isl-1}* (48-72 h DDH) en la postgena. (E) Defecto de cierre torácico y exceso de macroquetas SC (punta de flecha) causados por un clon y *2xUAS-tup^{IR}* (*arm-Gal4:VP16*, 24-48 h DDH). (F) Defecto de cierre torácico y cefálico (puntas de flecha) por sobreexpresión de *2xUAS-tup^{IR}* con *MS248*. (G) Defecto de polaridad de los tricomas causado por un clon *f tup^{ex4}* (72-96 h DDH). El clon gemelo *ck* está adyacente (contorno verde). (H) Defecto de fusión de terguitos por sobreexpresión de *2xUAS-tup^{IR}* con *tsh-Gal4*. (H') Defectos de pigmentación en clones *f tup¹* (flecha y puntas de flecha) inducidos en el periodo larvario. En el panel de la izquierda se muestra uno de ellos a mayor aumento. En H-H', la parte anterior queda a la izquierda.

ser mutantes o no; ver R6 y Fig. R5.G).

Fenotipos paralelos a éstos se dieron también en otras zonas del adulto. En el metatórax se observaron estructuras y depresiones con sensilas típicas de la parte proximal del halterio (Fig R6.B-C), que no existen en esta región en el individuo silvestre (Cole y Palka, 1982; Ouweneel y van der Meer, 1973), así como excrecencias e invaginaciones de la cutícula del metanotum (Fig R6.C). En esta región, que

normalmente no alberga órganos sensoriales de ningún tipo, también se observaron pequeñas quetas (Fig R6.B). En el occipucio y la postgena se encontraron esferas de cutícula como las observadas en el notum, así como macroquetas ectópicas (Fig R6.D-D'), y en el triángulo ocelar se observaron eliminaciones, fusiones y duplicaciones de ocelos (Fig. R6.D'').

Además, tanto mediante la inducción de clones como mediante la sobreexpresión de *UAS-tup^{IR}*, se observaron defectos en el cierre torácico (datos no mostrados y Fig. R6.E-F), el cierre cefálico (Fig. R6.F) y la fusión y pigmentación de los terguitos (Fig. R6.H-H'), además de producirse defectos de polaridad en el notum y el abdomen que se podían detectar en las quetas o en los tricomas de las células epiteliales (datos no mostrados y Fig. R6.G).

En conjunto, estos fenotipos sugieren, por un lado, una tendencia de los clones *tup* que se desarrollan en el notum a sufrir una transformación hacia territorio de axila, que se materializa en la aparición de estructuras genuinas de la axila o más imperfectamente en estructuras que contienen sensilas propias de esta zona. Por otro, evidencia una pérdida de afinidad celular con el tejido circundante, lo que se manifiesta en vesículas que pueden llegar a desgajarse del epitelio. Además, *tup* se requiere para la fusión de los epitelios contralaterales dorsales, y hasta cierto punto para la viabilidad del tejido y el establecimiento de una polaridad correcta.

R3-2 Fenotipos en discos imaginales

Alteración de la afinidad celular

La pérdida de *tup* produce con alta frecuencia la exclusión del tejido mutante de la epidermis adulta, efecto que no siempre parece asociado a un conflicto de identidad (Fig. R4.A-D). Así que estudié la morfología de estos clones en discos imaginales de tercer estadio. Los clones inducidos durante el primer período larvario presentan el borde liso y con frecuencia producen un surco alrededor (Fig. R7.A) y/o en el interior del clon (Fig. R7.B). Si se inducen en etapas posteriores, los clones tienen el contorno generalmente redondeado, pero no siempre liso, y con menor frecuencia producen pliegues, aunque sus células sufren una constricción apical (Fig. R7.C). Muchos clones tienden a excluirse del plano del epitelio, pues presentan una incipiente invaginación hacia la capa subyacente de células adepiteliales (Fig. R7.D-E). Algunos de estos clones podrían dar lugar a las vesículas parcial o totalmente excluidas que se observan en el adulto. Aún así, en discos larvarios nunca observé que estos clones perdieran sus conexiones apicales con el territorio heterozigótico (Fig. R7.D), lo cual sugiere que la exclusión del clon sigue progresando durante la pupación. Los clones tardíos con alteraciones de la afinidad celular (contorno redondeado, invaginación basal) se localizaban en la región que corresponde aproximadamente con la expresión fuerte de

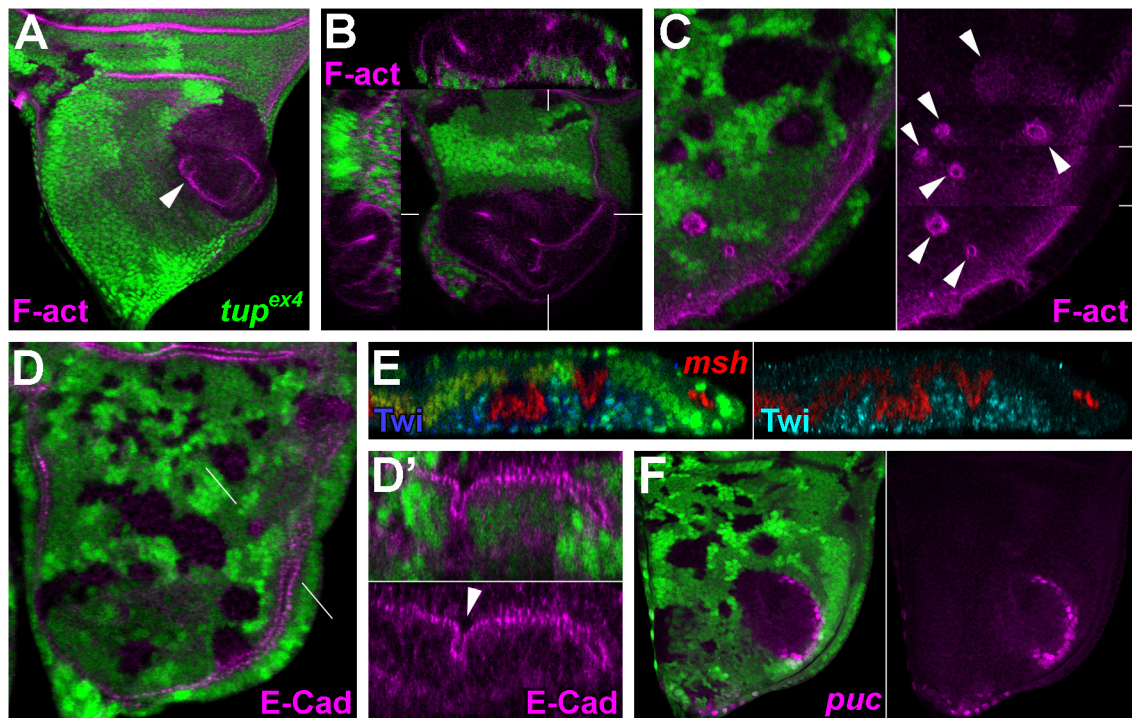


Figura R7. Alteraciones de la afinidad celular asociadas a la falta de *tup*. En todas las figuras, los clones homocigóticos para mutaciones se muestran por la ausencia de verde, y los clones de sobreexpresión, por la presencia del mismo color, salvo indicación contraria. En esta figura todos los clones son *tup^{ex4}*. (A,B) Clones inducidos a 24-48 h DDH que forman un pliegue (mostrado con una tinción de faloidina, morado) alrededor (A) o en el interior del clon (B, ver las proyecciones XZ y ZY indicadas por las líneas blancas). (C) Izquierda: clones en la región posterior y proximal del notum (72-96 h DDH) que muestran un contorno más o menos redondeado y sin pliegues. Derecha: las células mutantes sufren una constricción apical (puntas de flecha). El panel derecho muestra diferentes planos focales; la extensión de cada uno la delimitan las líneas horizontales blancas. (D) Clones inducidos a 72-96 h DDH con contornos irregulares, o muy redondeados (en la región posterior y proximal), teñidos con E-Cadherina (morado). Las líneas indican la proyección mostrada en D'. (D') Proyección en el plano XZ indicada con líneas blancas en D. El clon con un anillo de E-Cadherina en D sufre una invaginación (punta de flecha), pero no pierde el contacto apical con sus células vecinas (por la continuidad de E-Cadherina, en morado). (E) Proyección en el eje ZX, con la parte proximal del disco a la derecha. Clones inducidos a 72-96 h DDH que se extruyen hacia las células adepiteliales, marcadas con Twist (Tw, azul) y muestran un incremento en la expresión *msh* (*msh^{Δ89}-lacZ* en todas las figuras, rojo). (F) Clones inducidos a 72-96 h DDH. Uno de ellos, particularmente grande, expresa *puc* (*puc^{E69}-lacZ*, morado) en parte de su contorno, tanto en células del clon como células silvestres adyacentes.

tup en los discos de tercer estadio maduro.

En el disco imaginal de ala, la vía de señalización de la kinasa del N-terminal de *jun* (JNK) es importante para varios aspectos de la morfogénesis epitelial, como la eversión del disco y el cierre torácico (Agnès y cols., 1999; Martín-Blanco y cols., 2000; Pastor-Pareja y cols., 2004; Zeitlinger y Bohmann, 1999), el cierre de heridas y la regeneración (Bosch y cols., 2005; Galko y Krasnow, 2004; Ramet y cols., 2002) e interviene en la extrusión de tejido en ciertas condiciones mutantes (Gibson y Perrimon, 2005; Shen y Dahmann, 2005). En los clones *tup* de la región posterior y proximal, con frecuencia se observaba activación ectópica de la ruta de la JNK, revelada con la línea *puc-lacZ*, tanto autónoma como no autónomamente (Fig. R7.F).

Los clones de *tup* en el notum expresan marcadores de axila

Puesto que los clones *tup* producían en la cutícula adulta tejido con propiedades de axila, analicé el efecto de estos clones en la expresión larvaria de genes característicos de este territorio. En el disco silvestre de tercer estadio, *msh* se expresa fuertemente en

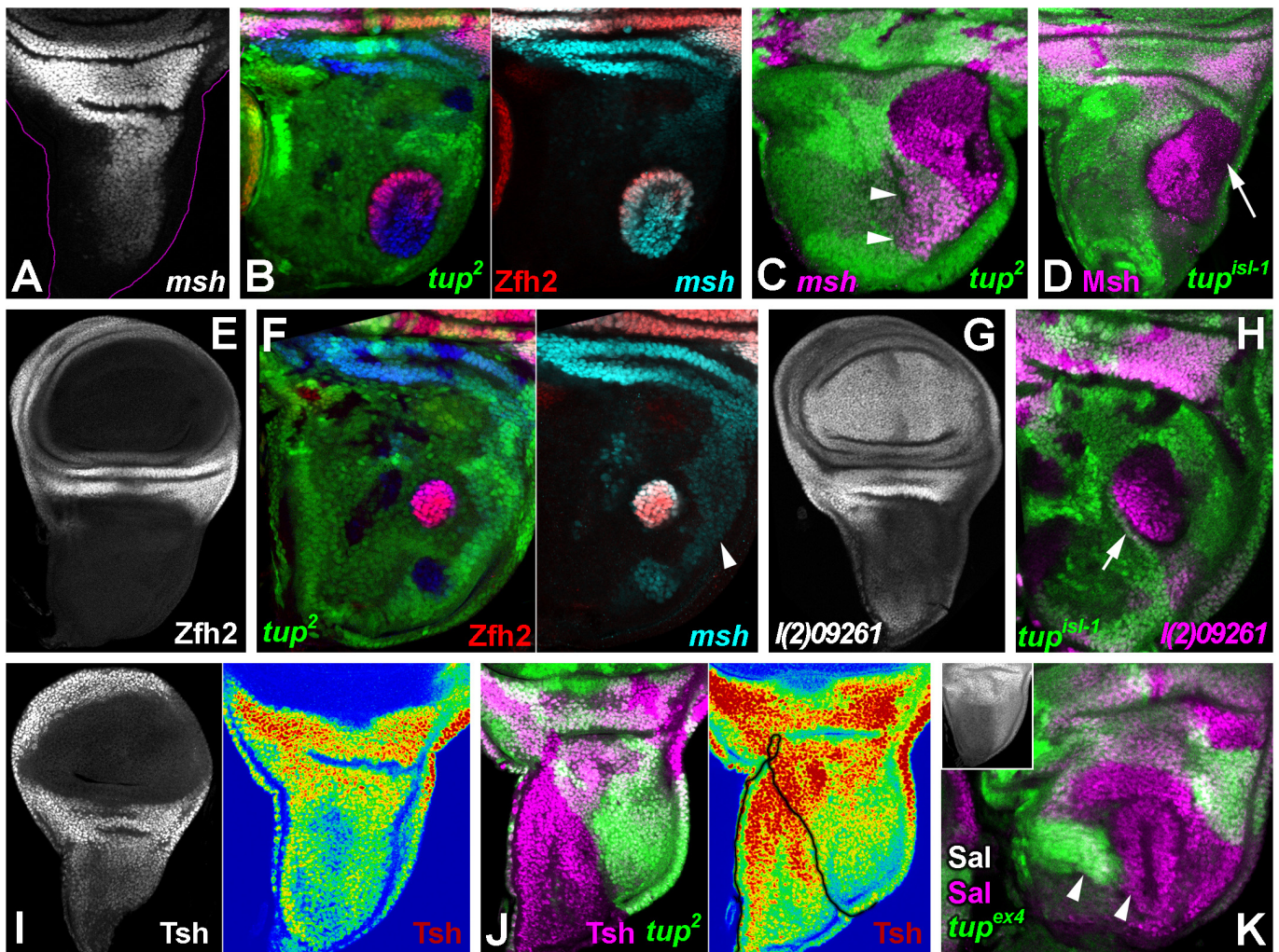


Figura R8. Efecto de la falta de *tup* en marcadores del territorio de axila alar. (A) Patrón de expresión silvestre de *msh-lacZ*. En morado, el contorno del disco. (B) Desrepresión de *msh-lacZ* (azul) y *zfh-2* (rojo) en un clon *tup²* (48-72 h DDH). (C) Desrepresión de *msh-lacZ* (morado) en un clon *tup²* (48-72 h DDH) y en tejido silvestre adyacente (puntas de flecha). (D) En un clon *tup^{isl-1}* (48-72 h DDH), la acumulación de Msh (morado) no se produce en todas las células (flecha). (E) Patrón de expresión silvestre de *zfh-2*. (F) Varios clones *tup²* (72-96 h DDH) expresan *msh-lacZ* (azul), pero sólo uno expresa *zfh-2*. La punta de flecha señala la expresión endógena de *msh* en el notum (comparar con A). (G) Patrón de expresión silvestre de la línea *lacZ l(2)09261*. (H) Clon *tup^{isl-1}* (48-72 h DDH) en el que se desreprime la línea *l(2)09261* (morado). (I) Patrón de expresión silvestre de *tsh*. Izquierda: Patrón del disco completo, señal directa de confocal. Derecha: vista aumentada de la región del notum y la axila dorsal, en otro disco, con el patrón visualizado con la intensidad asociada a una escala cromática. Los tonos cálidos, que aparecen en la axila, son los de mayor acumulación de Tsh. (J) Izquierda: clon *tup²* (24-48 h DDH) en el que *tsh* (morado) se desregula. Derecha: la visualización con escala cromática permite identificar la mayor acumulación de Tsh en el clon (contorno negro). (K) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en el que Sal (morado) se acumula ectópicamente (puntas de flecha, comparar con el patrón silvestre en el recuadro o en la Fig. R2.I).

toda la extensión próximo-distal de la región de axila dorsal. También está presente, aunque a niveles significativamente menores, en la región dorsal del ala y en la parte posterior del notum (D'Alessio y Frasch, 1996; Milán y cols., 2001; Villa-Cuesta y Modolell, 2005) (Fig. R8.A). En todos los clones *tup* inducidos en primer estadio larvario y desarrollados en las regiones medial y próximo-lateral del notum, *msh* se expresaba en cantidades propias de la axila, a veces incluso en las células silvestres que rodeaban el clon (Fig. R8.B-C). En los clones laterales más distales no observé esta desrepresión. Clones inducidos más tarde en el desarrollo tenían un comportamiento menos uniforme y sin componente no autónomo. Así, en los clones inducidos en tercer estadio, la desrepresión no ocurría en todos los casos, especialmente en los clones que crecían en la región anterior (Fig. R8.F y no mostrado). Asimismo, en algunos clones

originados en el segundo o tercer estadio, la desrepresión de *msh* elevaba los niveles de expresión por encima de los propios del notum, pero sin llegar a los mismos que ocurren en la axila (datos no mostrados); en otros casos, *msh* no se desregulaba en todas las células del clon (Fig. R8.D).

Resultados similares se obtuvieron con otros genes con expresión diferencial en la axila alar. *zn finger homeodomain 2* (*zfh-2*), cuyo patrón de expresión normal es un anillo que recorre toda la región distal de la axila dorsal y ventral (Whitworth y Russell, 2003) (Fig. R8.E), se expresaba ectópicamente dentro de clones *tup* localizados cerca de la región central del notum (Fig. R8.B,F). La inserción *l(2)09261* se expresa en las regiones presuntivas de axila, ala y pleura (Diez del Corral y cols., 1999) (Fig. R8.G). En clones *tup* en el notum también se detecta la expresión de esta línea lacZ (Fig. R8.H). *sal*, que se expresa en las regiones posterior y distal-lateral del notum (de Celis y cols., 1999) (Figs. R2.I y R8.K, recuadro), también se desreprime en clones *tup* (Fig. R8.K). *tsh* marca todo el disco excepto el territorio de ala, con menores niveles de expresión en el notum que en la axila (Diez del Corral y cols., 1999; Ng y cols., 1996; Wu y Cohen, 2002; Zecca y Struhl, 2002b) (Fig. R8.I). En clones tempranos de *tup* se observa un aumento de la acumulación de Tsh (Fig. R8.J). Como en el caso de *msh*, la desrepresión de estos marcadores era más patente en clones proximales que distales, en los tempranos que en los tardíos y, dentro de estos últimos, más en los posteriores que en los anteriores.

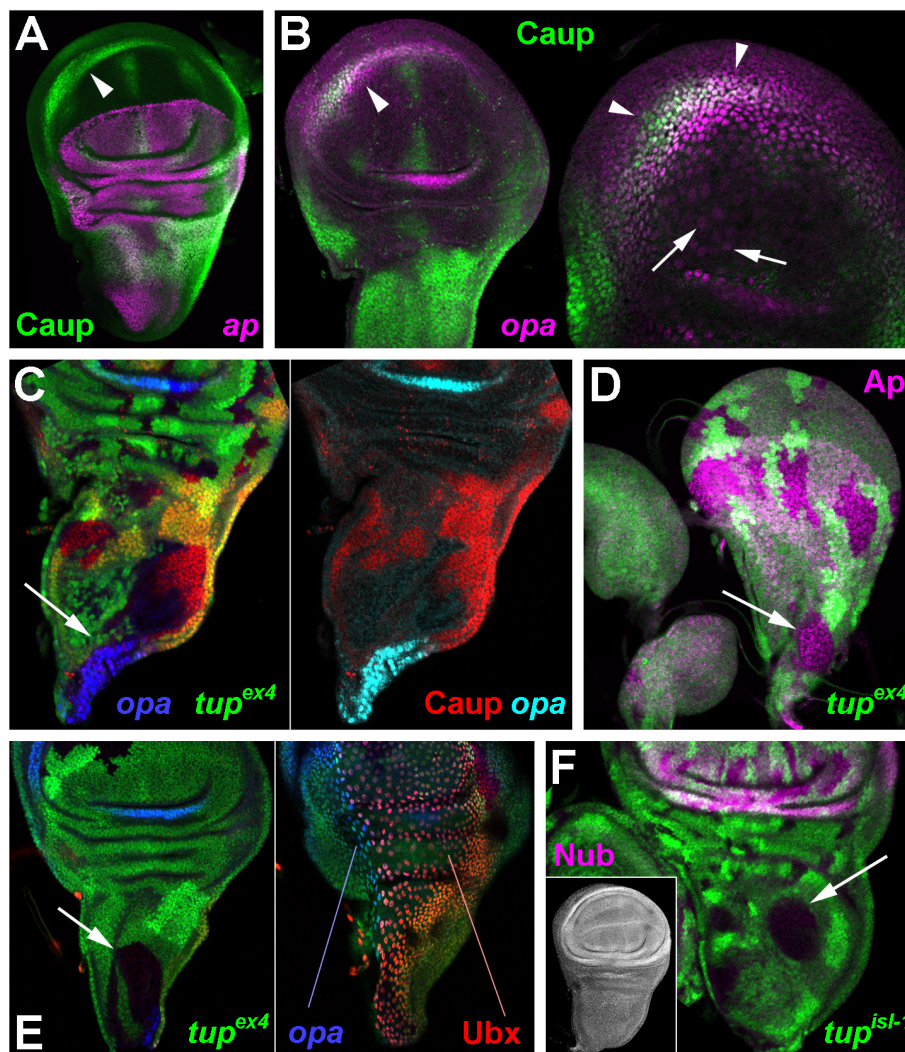
Efecto de los clones *tup* en marcadores de otros territorios

A excepción de *zfh-2*, ninguno de los marcadores de axila utilizados era estrictamente exclusivo de este territorio. No todos los clones *tup* en el notum expresaban *zfh-2* y, por tanto, cabía que las estructuras de identidad incierta asociadas a los clones *tup* en el notum adulto, fueran transformaciones incompletas no a axila, sino a otras regiones del tórax, y en particular a la pleura, por la pigmentación y la expresión de los marcadores utilizados. Para evaluar esta posibilidad, investigué la expresión de marcadores adicionales.

La pleura es una estructura ventral en la que no se expresa el gen selector dorsal *ap* (Cohen y cols., 1992) (Fig. R9.A) pero en la que sí se coexpresan *ara/caup* y *odd-paired* (*opa*) (Butler y cols., 2003; Gómez-Skarmeta y cols., 1996) (Fig. R9.A-B). Así pues, un territorio del disco que se transformara en pleura debería exhibir simultáneamente la pérdida de expresión de *ap* y la adquisición de la de *opa* y la de *ara/caup*. Esta circunstancia no se da en los clones *tup*. Aunque en algunos clones proximales y tempranos se produce la desrepresión del marcador *opa*, ésta no es simultánea con la de *ara/caup* (Fig. R9.C) y tampoco se pierde la expresión de *ap* (Fig. R9.D).

opa se expresa también en la membrana peripodial (Fig. R9B,E). Me aseguré de que la expresión ectópica de *opa* en los clones *tup* no indicaba una transformación peripodial al comprobar que estos clones no expresaban *Ubx* (Fig. R9.E). (En los

Figura R9. Efecto de la falta de *tup* en marcadores del territorio de mesopleura y ala. (A) Expresión silvestre de *ara/caup* (verde) y *ap-lacZ* (morado). *ap* no se expresa en el territorio de mesopleura (punta de flecha) pero *ara/caup* sí lo hacen. (B) Expresión silvestre de *ara/caup* (verde) y *opa-lacZ* (morado). Izquierda: *opa-lacZ* se expresa en la mesopleura presuntiva (punta de flecha) y en dos arcos horizontales en el territorio de ala. Derecha: detalle de la coexpresión de *ara/caup* y *opa-lacZ* en la mesopleura (puntas de flecha). La expresión de *opa-lacZ* se extiende por la membrana peripodial (flechas). (C) Clon *tup^{ex4}* (48-72 h DDH) que expresa ectópicamente *opa-lacZ*, pero no *ara/caup*, en su parte proximal (flecha). (D) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en un disco de tercer estadio medio. La expresión de *ap* no se pierde (flecha). (E) Izquierda: clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH, flecha) que no expresa ectópicamente *opa-lacZ* (azul) ni tampoco *Ubx* (rojo). Derecha: en el mismo disco, *opa-lacZ* y *Ubx* se expresan en la membrana peripodial. (F) Clon *tup^{isl-1}* (48-72 h DDH) que no expresa ectópicamente *nub* (morado, su expresión silvestre en blanco en el recuadro).



discos mesotorácicos, *Ubx* se detecta en la membrana peripodial; Brower, 1987; White, 1984.)

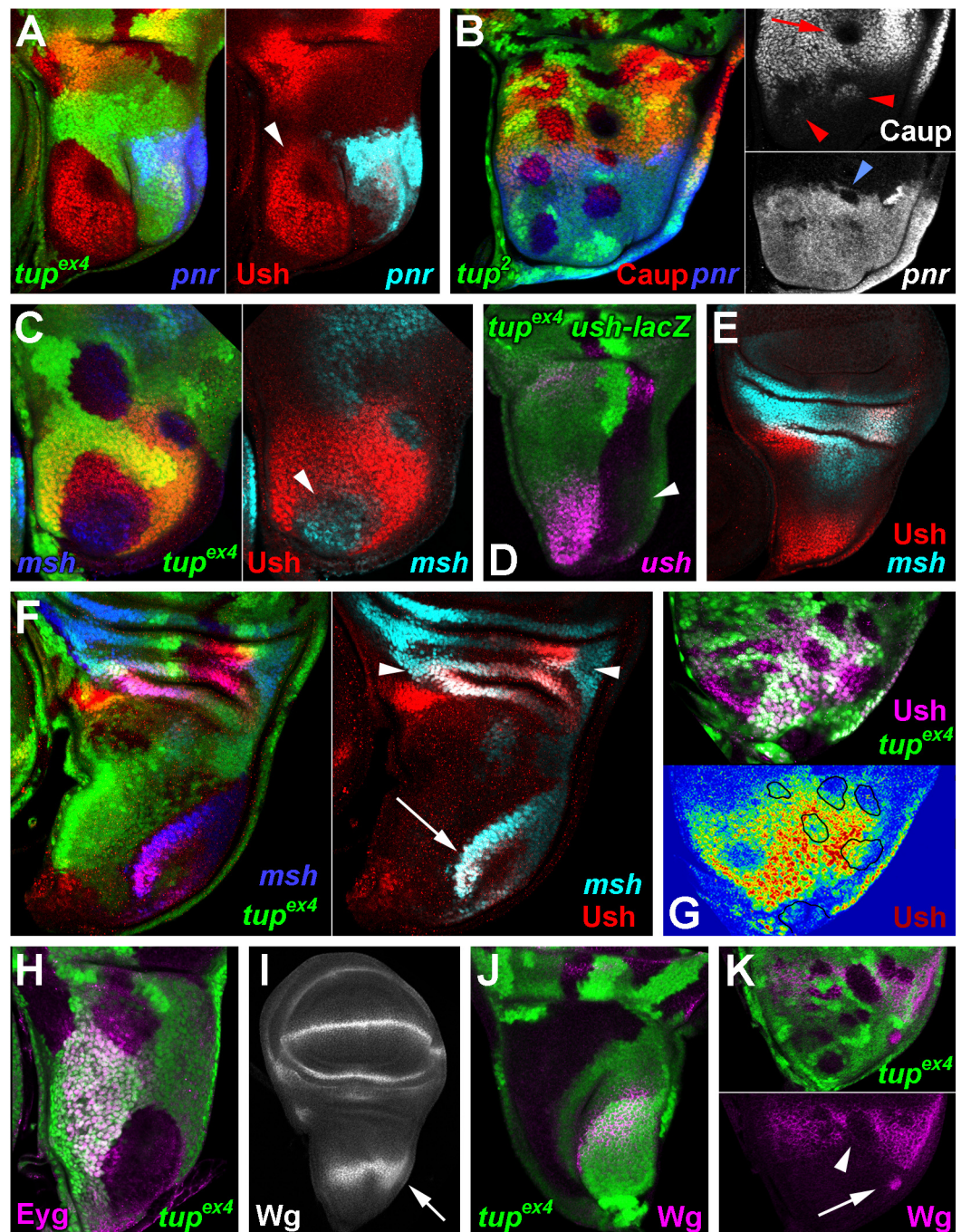
Comprobé también que en los clones *tup* no se desreprimen marcadores de ala, como el gen *nubbin* (*nub*) (Cifuentes y García-Bellido, 1997; Ng y cols., 1995) (Fig. R9.F) y la línea *L3-TSM-lacZ* (Gómez-Skarmeta y cols., 1995) (datos no mostrados).

Los clones *tup* pierden expresión de marcadores de notum

A continuación estudié el efecto de los clones *tup* en diversos marcadores de notum. Los genes *pnr* y *ush* se expresan en la región proximal del notum, estando el dominio de *ush* comprendido dentro del de *pnr* (Cubadda y cols., 1997; Romain y cols., 1993; Sato y Saigo, 2000; Tomoyasu y cols., 2000) (Fig. R2.E,H). En los clones *tup* inducidos durante el primer estadio larvario, la expresión de *pnr* se perdía en todos los casos (Fig. R10.A). En general, esto también ocurría en los clones inducidos más tardíamente. Sin embargo, un 15% (aprox.) de estos clones, localizados preferentemente en la región proximal del dominio de expresión de *pnr*, mantenían la expresión de este gen (Fig. R10.B). En cuanto a *ush*, su expresión desaparecía en clones inducidos en primer y segundo

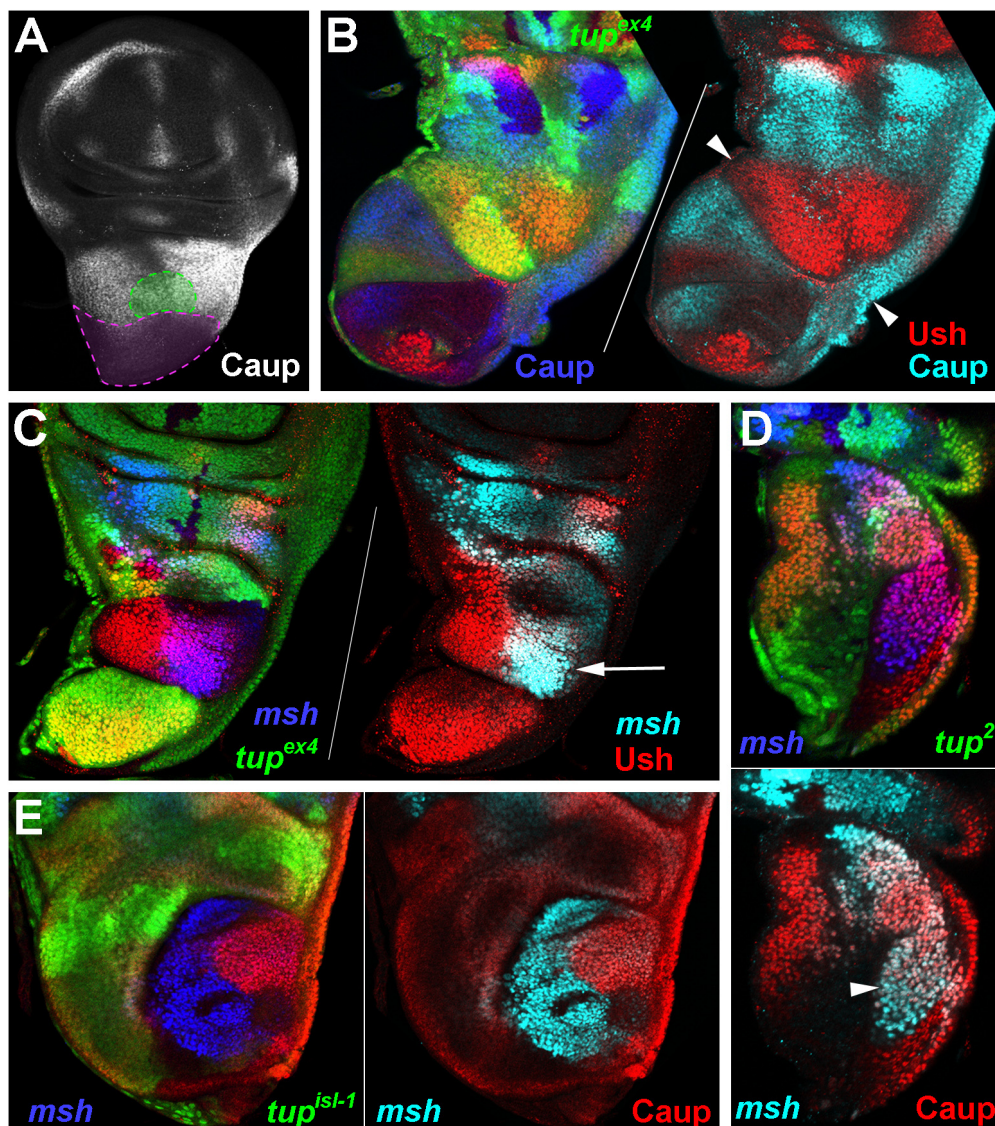
estadio, y se reducía en los inducidos en el tercero (datos no mostrados y Fig. R10.C,G). No obstante, en algunos clones inducidos en primer estadio, *ush* se expresaba en una región del clon (Fig. R10.A,F), a menudo coincidiendo con un pliegue del epitelio producido dentro del clon (Fig. R10.F). Estos clones coexpresaban *msh* (Fig. R10.E-F) y perdían la expresión de *pnr* (Fig. R10.A). Puesto que en los discos silvestres *ush* también se expresa en una parte del territorio de axila surcada de pliegues (Fig. R10.F), esto sugiere que esta expresión de *ush* en los clones tempranos se debe a la transformación del tejido mutante en territorio de axila. La línea *ush-LacZ* también cesaba de expresarse en los clones *tup* tempranos (Fig. R10.D), si bien esto no ocurría en todos los casos. El gen *eyg*, que marca el scutum presuntivo (Aldaz y cols., 2003), también dejaba de

Figura R10. Efecto de la falta de *tup* en marcadores del territorio de notum. (A) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en el que se pierde la expresión de *pnr* (azul) y se expresa ectópicamente *ush* (rojo). (B) Clones *tup²* (72-96 h DDH) en los que la expresión de *ara/caup* (rojo o blanco) se pierde (flecha) o se activa ectópicamente (puntas de flecha rojas) y la de *pnr* (azul o blanco) se pierde (punta de flecha azul) o no se altera. (C) Clones *tup^{ex4}* (48-72 h DDH) en los que la expresión de *ush* (rojo) se pierde y aumenta la de *msh* (azul). (D) Clon *tup^{ex4} ush-lacZ* (24-48 h DDH) en el que se pierde la expresión de *ush* (morado, punta de flecha). (E) Expresión silvestre de *ush* (rojo) y *msh* (azul). Ambos se coexpresan en parte del territorio de axila. (F) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en el que se expresa *ush* (rojo, flecha) y *msh* (azul). El clon muestra un pliegue interno. El territorio de axila que expresa *ush* posee varios pliegues (puntas de flecha). (G) Arriba: Clones *tup^{ex4}* (72-96 h DDH) en los que se reduce la expresión de *ush* (morado, puntas de flecha). Abajo: En los clones (contorno negro) la expresión de *ush* (en escala cromática) se reduce. (H) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en el que se pierde la expresión de *eyg* (morado). (I) Expresión silvestre de *wg*. (J) Clon *tup^{ex4}* (24-48 h DDH) en el que se pierde la expresión notal de *wg* (morado). (K) Clones *tup^{ex4}* (72-96 h DDH). En algunos se pierde la expresión de *wg* (morado, punta de flecha) mientras que en uno de los clones mediales se detecta ectópicamente (flecha).



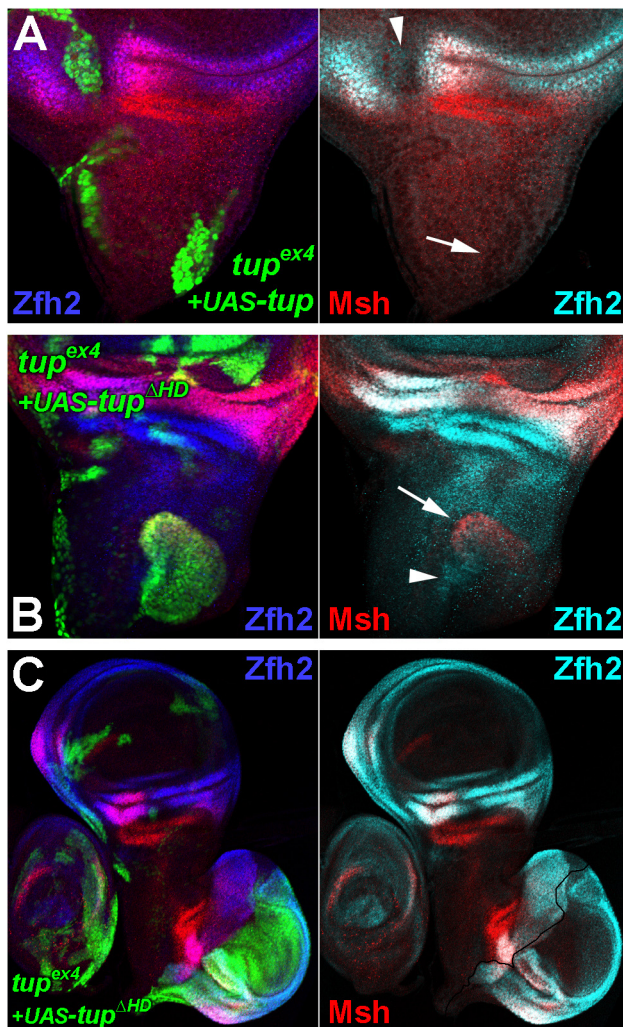
expresarse en los clones inducidos en primer estadio (Fig. R10.H), aunque se mantenía en los más tardíos (datos no mostrados). Por otro lado, la banda de expresión de *wg* propia del notum (Baker, 1988; Phillips y Whittle, 1993) (Fig. R10.I) desaparecía en los clones inducidos tempranamente (Fig. R10.J), y su expresión en el territorio silvestre sufría efectos no autónomos de diversa índole (datos no mostrados). En los clones tardíos, la expresión de *wg* podía reducirse, pero también aparecer ectópicamente en la región medial del notum (Fig. R10.K).

El espectro de fenotipos adultos asociado a los clones *tup* tiene gran parecido con los que producen los clones nulos para el C-Iro, especialmente por la aparición de tégulas ectópicas, escleritos, lesiones en el notum lateral y esferas de vesícula (Diez del Corral, 1998; Diez del Corral y cols., 1999). Por tanto, la aparición de estructuras adultas y marcadores genéticos de axila en los clones *tup* podría deberse a la pérdida de *ara/caup*. Sin embargo, esta no es la razón, puesto que la expresión de *ara/caup* en los clones *tup* sólo se pierde consistentemente cuando éstos crecen en una región central



del disco bastante pequeña (Figs. R11.A y R10.B). Esta región no corresponde a la zona en la que los clones son más propensos a expresar ectópicamente marcadores de axila, ni tampoco a aquella en la que, en el adulto, los clones producen más frecuentemente estructuras de axila. Además, en algunos clones en la región del notum medial,

Figura R12. El homeodominio de Tup es necesario para la especificación del notum. (A) Clon *tup^{ex4}+UAS-tup* (24-48 h DDH, verde). Los marcadores de axila *msh* (rojo) y *zfh-2* (azul) no se expresan en el clon del notum (flecha), y en cambio se reprimen en el que crece en su dominio normal de expresión (punta de flecha). (B) Clon *tup^{ex4}+UAS-tup^{ΔHD}* (24-48 h DDH) que expresa ectópicamente *zfh-2* (azul, flecha) y *msh* (rojo, punta de flecha, sin llegar a las cantidades del territorio de axila). (C) Clon *tup^{ex4}+UAS-tup^{ΔHD}* (24-48 h DDH) que produce un gran sobrecrecimiento y la expresión ectópica de *msh* (rojo) y *zfh-2* (azul), con gran componente no autónomo. El contorno negro (derecha) marca el límite del clon.



ara/caup se desreprime (Fig. R10.B).

En esta zona del disco, la actividad del dímero represor Pnr•Ush impide la expresión de *ara/caup* (Calleja y cols., 2000; Haenlin y cols., 1997; Letizia y cols., 2007). En tal caso, la pérdida de *pnr* o *ush* en los clones *tup* podría dar cuenta de la expresión ectópica de *ara/caup* en los mismos. Esto es lo que parece ocurrir puesto que, aunque *pnr* no siempre desaparece de los clones en los que se activa ectópicamente *ara/caup* (Fig. R10.B), *ush* sí que se pierde o reduce (Fig. R10.C-D,G).

Los genes del C-Iro impiden la expresión de *msh* a altos niveles en el notum durante la especificación de este territorio (Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Así pues, la aparición ectópica de *msh* en clones que perdieran la expresión de *ara/caup* era de esperar. De hecho, en algunos clones la desrepresión de *msh* ocurría en células que no expresaban *ara/caup* (Fig. R11.E). Sin embargo, la desrepresión de *msh* y la pérdida de expresión de *ara/caup* ocurre frecuentemente en zonas distintas del disco y, de hecho,

msh también podía activarse en clones donde *ara/caup* no se reprimía o se activaba ectópicamente (datos no mostrados). Así, en células de algunos clones Msh y Ara/Caup coexistían a niveles relativamente altos (Fig. R11.D), situación que no se produce en el tipo silvestre.

Es de destacar que una fracción de los clones inducidos en primer estadio

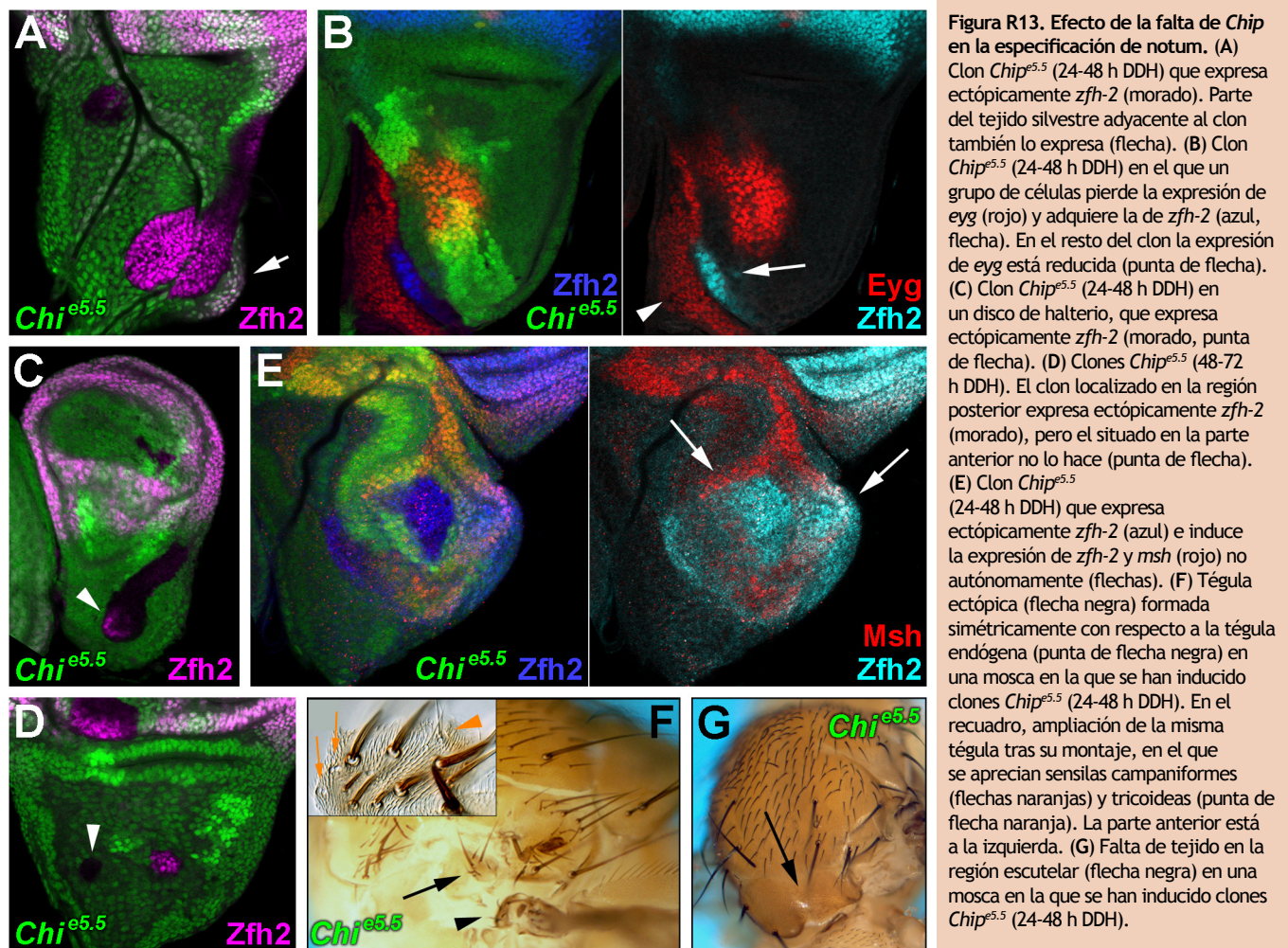
larvario crecían en exceso. En estos clones el patrón de expresión de *ush* y del C-Iro estaban muy alterados, con un fuerte componente no autónomo (Fig. R11.B-C). Aunque tales clones expresaban supuestamente marcadores de axila, los marcadores de notum no se perdían en todo el territorio mutante.

La especificación del notum requiere el homeodominio de Tup

Durante la formación del patrón de órganos sensoriales del notum, Tup antagoniza la actividad de Chip y Pnr uniéndose a ambos por medio de sus dominios LIM. Para ejercer esta función, el homeodominio de Tup parece prescindible (Biryukova y Heitzler, 2005). Así que quise comprobar si ocurría lo mismo en la función de *tup* durante la especificación del notum. Mediante la técnica MARCM (Lee y Luo, 1999), induje en segundo estadio larvario clones *tup^{ex4}* que además expresaban *UAS-tup*, o bien una forma de Tup carente del homeodominio (*UAS-tup^{ΔHD}*), y examiné su efecto en marcadores de axila en discos imaginales. De este modo, podía comprobar el efecto de sustituir el gen endógeno por sus versiones completa y truncada. El transgén *UAS-tup* eliminaba la aparición de marcadores de axila en los clones (Fig. R12.A), mientras que *UAS-tup^{ΔHD}*, no sólo no impedía la transformación del clon (Fig. R12.B), sino que en algunos casos la potenciaba, y el efecto no autónomo era mayor e inducía grandes sobrecrecimientos (Fig. R12.C). Por tanto, el homeodominio de Tup es imprescindible para la especificación del notum.

R4 *Chip* y *Ssdp* también se requieren en la especificación de notum

Las proteínas LDB/NLI/CLIM son cofactores que interaccionan con todas las proteínas LIM-HD (revisado en Bach, 2000; Dawid y cols., 1998; Matthews y Visvader, 2003). El homólogo en *Drosophila* de estos cofactores es Chip, y puede formar complejos con Tup (Biryukova y Heitzler, 2005; van Meyel y cols., 1999). Esta interacción es relevante durante el establecimiento del patrón de órganos sensoriales del notum, en el que Tup, secuestrando a Chip y Pnr, inhibe la expresión de los genes proneurales (Biryukova y Heitzler, 2005). Para averiguar si esta interacción también participaba en la especificación del notum, examiné el requerimiento de *Chip* para establecer dicha especificación. Los clones nulos *Chip^{es5.5}*, inducidos en el primer estadio larvario, expresaban *zfh-2* en el 86% de los casos (N=21) y perdían la expresión de *eyg* en el 88% de los casos (N=16) (Fig. R13. A-B, E-D). En el disco de halterio también se observaron clones que expresaban *zfh-2* (Fig. R13.C). Estos cambios de expresión podían afectar a todo el clon o sólo a parte de sus células, pero aquellas que adquirían la expresión de *zfh-2* siempre perdían la de *eyg* (Fig. R13.B), y en algunos casos se inducía no-autónomamente la expresión de *zfh-2* en las células vecinas (Fig. R13.A). Clones más tardíos sólo expresaban ectópicamente *zfh-2* si crecían en el dominio de expresión tardía de *tup* (Fig. R13.D). Estos resultados sugieren que los clones *Chip* en el notum se transforman a axila si se

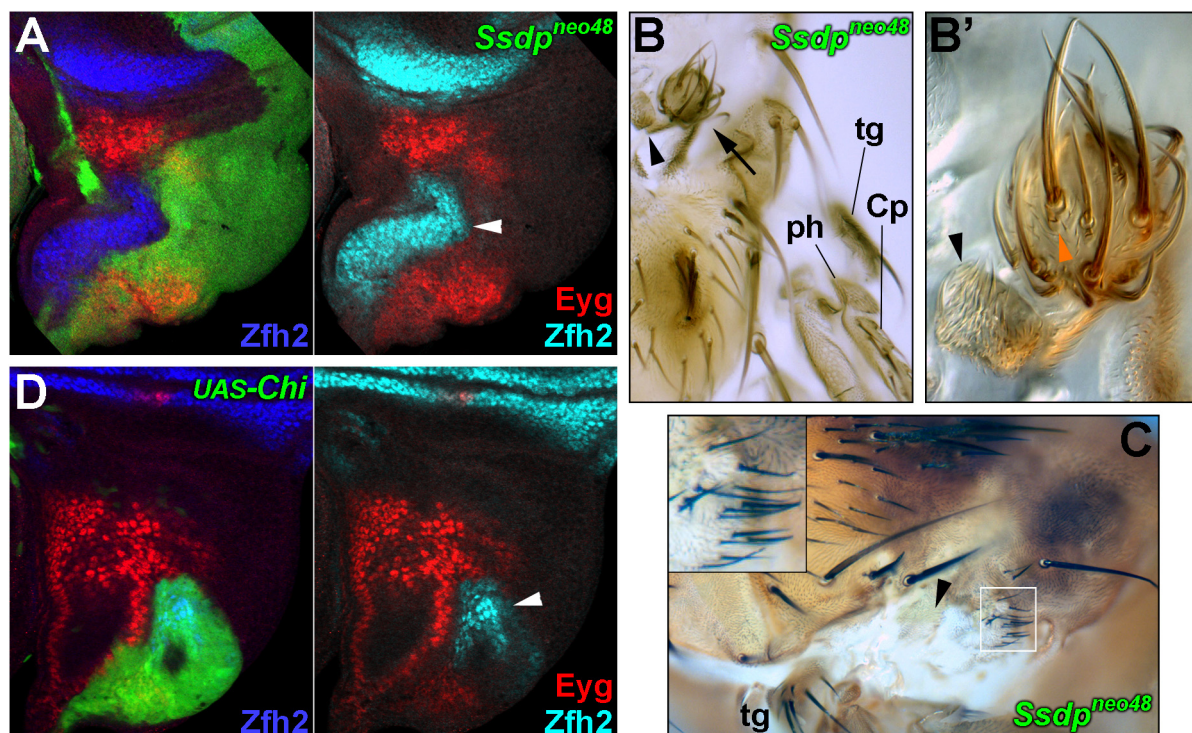


inducen temprano en el desarrollo. Hay que aclarar que en estos clones no se detectó expresión de *msh*, salvo de manera no autónoma en algún caso aislado (Fig. R13.E). Esta observación parece contradecir la hipótesis de que los clones *Chip* se transforman en territorio de axila, pero este no es el caso, puesto que la función de *Chip* se requiere para la expresión de *msh* en el territorio de axila (Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Así, la falta de *Chip* en el notum provoca la transformación hacia un territorio de axila defectiva para *msh*, lo cual no impide que si el tejido circundante al clon se transforma por efecto no autónomo, éste sí sea capaz de expresar *msh*. Los clones *Chip* inducidos en primer estadio producen en individuos adultos lesiones similares a algunas de las que se observan en los clones *tup*, como ausencia de tejido del scutellum o del scutum lateral-posterior, masas de tejido esclerotizado con sensilas tricoideas, defectos del cierre torácico, protuberancias y, en ocasiones, duplicaciones de tégulas (Fig. R13.F). Las moscas que albergan clones *Chip* inducidos en el tercer estadio larvario, presentan falta de tejido en el escutelo, esferas de cutícula insertas en el interior del notum y alteraciones del patrón de quetas (Fig. R.13.G y datos no mostrados).

Puesto que la falta de actividad de *tup* o *Chip* producen transformaciones similares, no parece plausible que la función de *Tup* en la especificación del notum consista en secuestrar a *Chip* impidiendo así su actividad, como se ha descrito para el

prepatrón de órganos sensoriales (Biryukova y Heitzler, 2005). Parece más bien que Tup ejerce su función de especificación del notum a través de un complejo hexamérico 2Tup•2Chip•2Ssdp (Fig. I10.A), tal como ocurre en el ala dorsal con Ap. Si este fuera el caso, *Ssdp* también debería requerirse para especificar el notum. *Ssdp*, que se expresa ubicuamente en el disco de ala, se requiere para la supervivencia celular (van Meyel y cols., 2003) y los clones nulos para *Ssdp* apenas crecen, incluso utilizando la técnica *Minute* (datos no mostrados). Así pues, analicé el efecto de clones del alelo hipomorfo *Ssdp^{neo48}*. Cuando éstos se inducen en el primer estadio larvario expresan *zfh-2* ectópicamente en el notum en un 41% (N=29) de los casos (Fig. R14.A). Esta expresión ectópica concursa siempre con la pérdida de la de *eyg*, aunque puede no afectar a todo el territorio mutante. Además, las moscas adultas en las que se han inducido clones *Ssdp^{neo48}* en primer estadio muestran lesiones similares a las asociadas a clones *Chip*, que pueden alojar sensilas tricoideas (Fig. R14.C), que son muy típicas, aunque no exclusivas, de la axila. En una ocasión, se llegó a desarrollar una protuberancia formada por tejido de la costa del ala (Fig. 14.B-B'), reconocible por la presencia de brácteas asociadas a las quetas (brácteas que sólo se encuentran en la región distal de la pata y en la costa proximal; Bryant, 1975; Hannah-Alava, 1958; Peyer y Hadorn,

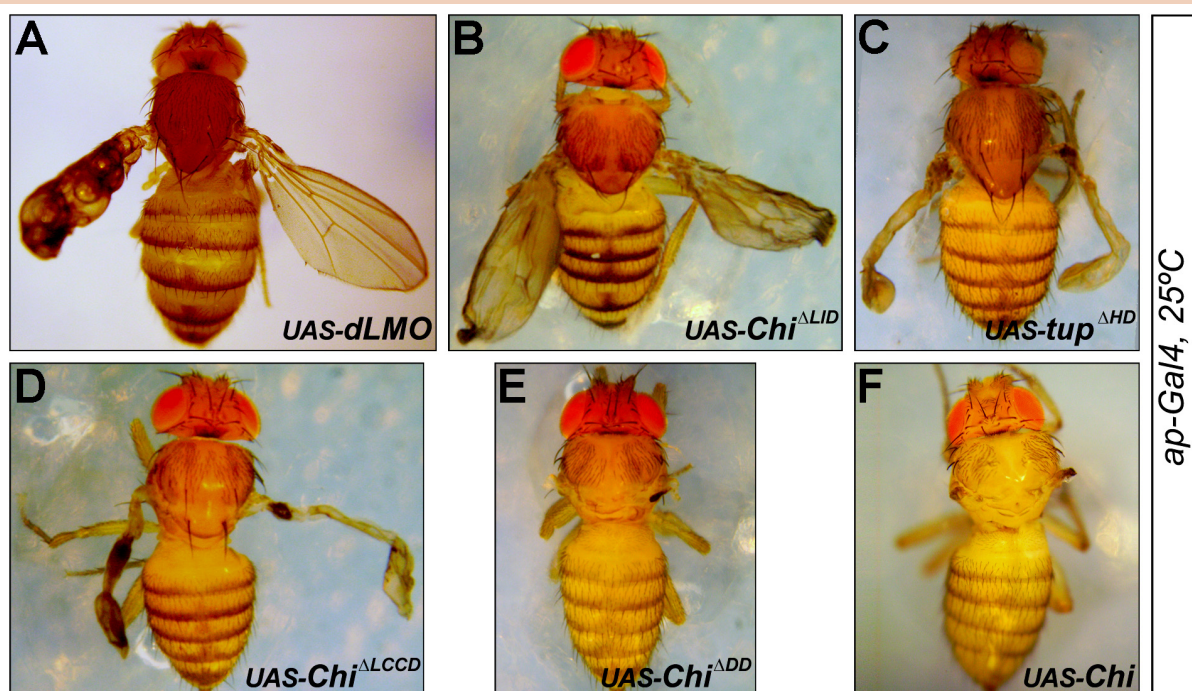
Figura R14. Efecto de la falta de *Ssdp* y el exceso de *Chip* en la especificación de notum. (A) Clon *M⁺ Ssdp^{neo48}* (24-48 h DDH). Parte del clon pierde la expresión de *eyg* (rojo) y adquiere la de *zfh-2* (azul, punta de flecha). (B) Estructura ectópica compuesta por tejido de costa proximal (flecha) y posiblemente la placa humeral (punta de flecha), en una mosca en la que se han inducido clones *Ssdp^{neo48}* (24-48 h DDH). tg, Cp, y ph: tégula, costa proximal y placa humeral endógenas, respectivamente. (B') Ampliación de la estructura en B, en la que se reconocen las brácteas que acompañan a los órganos sensoriales de la costa proximal (la punta de flecha naranja indica una de ellas). La punta de flecha negra indica la posible placa humeral ectópica. (C) Lesión cuticular (punta de flecha) en una mosca en la que se han inducido clones *Ssdp^{neo48}* (24-48 h DDH). La lesión alberga varias sensilas tricoideas (recuadros blanco y negro). tg, tégula. La parte anterior está a la izquierda. (D) Clon *UAS-Chip* (*act-Gal4*, 24-48 h DDH). Parte del clon pierde la expresión de *eyg* (rojo) y adquiere la de *zfh-2* (azul, punta de flecha).



1965). Por tanto, la función de *Ssdp* se necesita para la especificación del notum, lo cual refuerza la hipótesis de que *Tup* ejerce su función “pronotum” formando un complejo hexamérico 2*Tup*•2*Chip*•2*Ssdp*.

La arquitectura de los complejos LIM-HD•*Chip*•*Ssdp*, conformada en torno a un homodímero *Chip*•*Chip* (Fig. I10.A), permite secuestrar a los miembros del complejo en versiones incompletas del mismo mediante la sobreexpresión de *Chip* o diversas formas truncadas del mismo (Fernández-Fúnez y cols., 1998; Milán y Cohen, 1999; Rincón-Limas y cols., 2000). De este modo, un exceso de *Chip* podría mimetizar el efecto de su falta de función. Asimismo, un exceso del regulador dLMO o *Tup*^{ΔHD}, podrían competir con el *Tup* endógeno por su posición en el complejo, producir versiones incapaces de unirse al ADN y reducir la cantidad de complejos funcionales (Milán y cols., 1998; O’Keefe y cols., 1998; Zeng y cols., 1998). Por tanto, para comprobar que en efecto *Tup*, *Chip* y *Ssdp* actúan como el descrito hexámero en la especificación del notum, induje clones que sobreexpresaran *UAS-Chip*, *UAS-Chip*^{ΔDD}, *UAS-Chip*^{ΔLID}, *UAS-Chip*^{ΔLCCD}, *dLMO*^{EP1383} o *UAS-tup*^{ΔHD}. Los clones inducidos en primer estadio que sobreexpresaban *UAS-Chip* y que se dejaban crecer hasta avanzado el tercer estadio, impedían la expresión de *eyg* o promovían la de *zfh-2* (Fig. R14.D) en un 70% de los casos (N=20). Este efecto también pudo verse con *UAS-Chip*^{ΔDD} (datos no mostrados), aunque no con los demás transgenes (no mostrado); en el caso de *UAS-tup*^{ΔHD} se intentó también con dos copias del transgén, sin éxito (no mostrado). Es de destacar que los transgenes *UAS-Chip* y *UAS-Chip*^{ΔDD} son los únicos capaces de eliminar por completo el desarrollo del ala en experimentos de sobreexpresión con la línea

Figura R15. Capacidad relativa de distintas líneas UAS para interferir con la función del complejo Ap•*Chip*•*Ssdp*. Individuos adultos que sobreexpresan distintas líneas UAS con *ap*^{MD544} a 25°C. (A) *EP1383* (*UAS-dLMO*). (B) *UAS-Chip*^{ΔLID}. (C) *UAS-tup*^{ΔHD}. (D) *UAS-Chip*^{ΔLCCD}. (E) *UAS-Chip*^{ΔDD}. (F) *UAS-Chip* (silvestre). Sólo en E y F se elimina por completo la formación del ala.



ap^{MD544}-*Gal4* (Calleja y cols., 1996) (Fig. R15.E-F). El resto produjeron, con la misma línea, fenotipos hipomorfos más o menos fuertes de *ap* (Fig. R15.A-D). Por tanto, puede que la ineficiencia de estos transgenes para interferir con la especificación del notum se deba a que son líneas de expresión débil o sus productos más inestables. Se puede concluir que la especificación del notum es sensible al exceso de Chip de manera similar a los complejos Ap•Chip•Ssdp que especifican el ala dorsal. Esto sugiere que la especificación del notum se produce mediante complejos Tup•Chip•Ssdp.

R5 *tup* y el C-Iro imponen sinérgicamente la identidad de notum

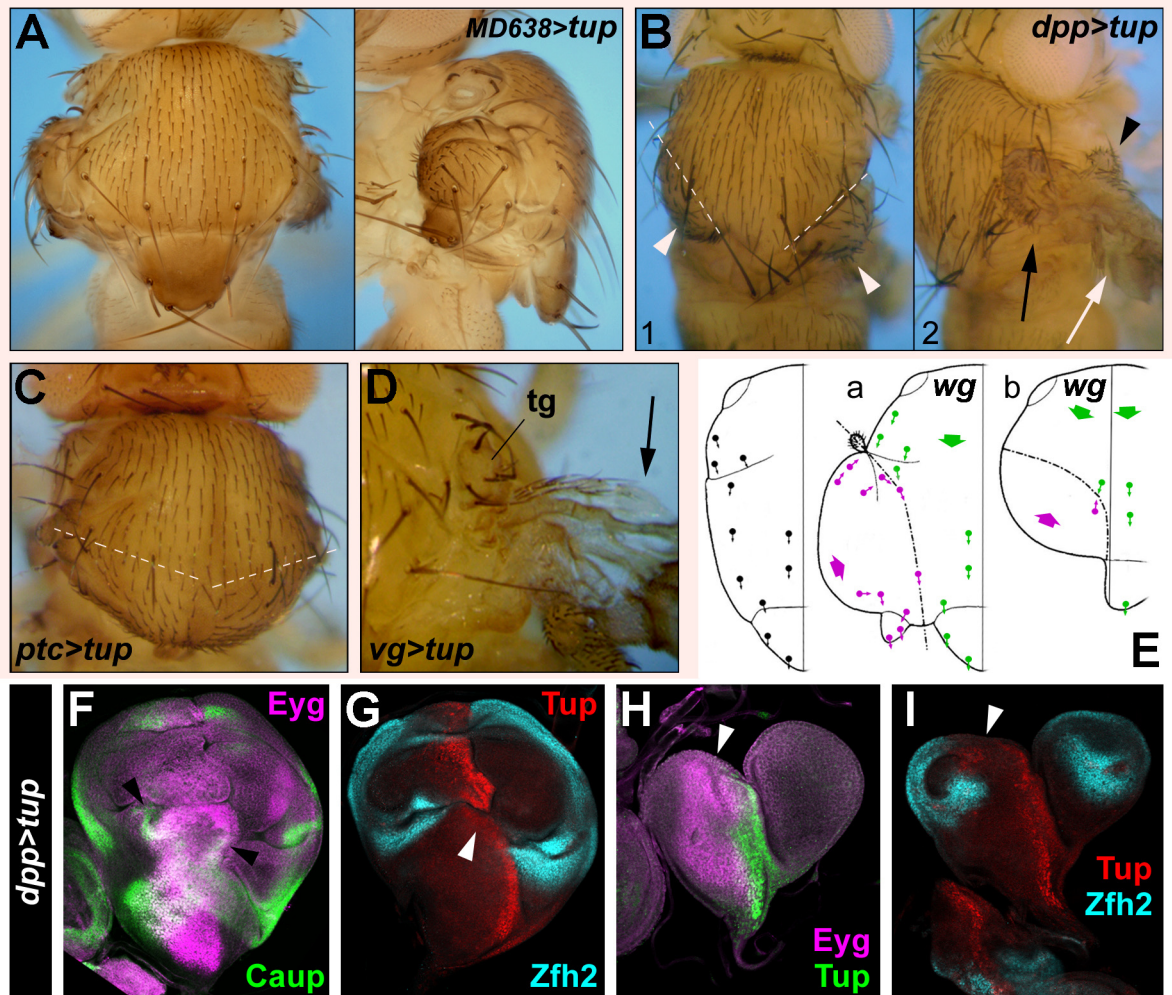
Los fenotipos de falta de función de *tup* examinados hasta ahora indican que su función se necesita para que las células del notum adquieran esta identidad. Por tanto, analicé la capacidad de *tup* de imponer el programa de diferenciación de notum en células que normalmente producirían otras estructuras.

R5-1 La sobreexpresión de *tup* puede producir duplicaciones de notum

La sobreexpresión del transgén *UAS-tup* (Thor y Thomas, 1997) con varias líneas *Gal4* compromete la viabilidad del individuo (*en-Gal4* y *ptc*^{559.1} a 25°C, *tsh*^{MD621} y *omb-Gal4* a 17°C). También interfiere con el crecimiento y la adquisición del patrón correcto de los tejidos, incluso el de aquellos en los que normalmente *tup* se expresa (Fig. M5.E). Este efecto probablemente se debe en parte a la inducción de apoptosis (Fig. S4). Sin embargo, con algunas líneas *Gal4* de expresión temprana en el ala (*dpp*^{blk}, *ptc*^{559.1} y *MD638*) se obtienen duplicaciones de notum con diversa expresividad (Fig. R16.A-C, ver más adelante). Estas duplicaciones son muy parecidas a las que se observan en mutantes *wg* (Couso y cols., 1993; Deak, 1978; Morata y Lawrence, 1977; Ng y cols., 1996; Sharma y Chopra, 1976) (Fig. R16.E). En el disco imaginal, estas duplicaciones se manifestaron en la expresión ectópica de *eyg*, *ara/caup* y *pnr* en la región del ala (Fig. R16.F-G). Las sobreexpresiones con líneas *Gal4* suaves, o de activación tardía, afectaban casi en exclusiva a la formación del patrón de órganos sensoriales (ver más adelante).

Estudí el efecto de clones de sobreexpresión de *UAS-tup*, pero su análisis no fue muy informativo. Estos clones raramente sobrevivían hasta la etapa adulta, y solamente en el notum (datos no mostrados). Allí los clones producían protuberancias en el tejido de notum similares a algunos de los fenotipos de falta de función (ver Fig. R5.E-F). Analicé estos mismos clones en el disco imaginal. Cuando se inducían en el primer estadio, los clones presentaban contornos lisos, y producían malformaciones graves del disco a menudo con efecto no autónomo (Fig. R17.C). A veces, cuando los clones crecían en el territorio de ala, algunas células se separaban del clon y adoptaban una morfología redondeada (Fig. R17.A) y se producía apoptosis (Fig.

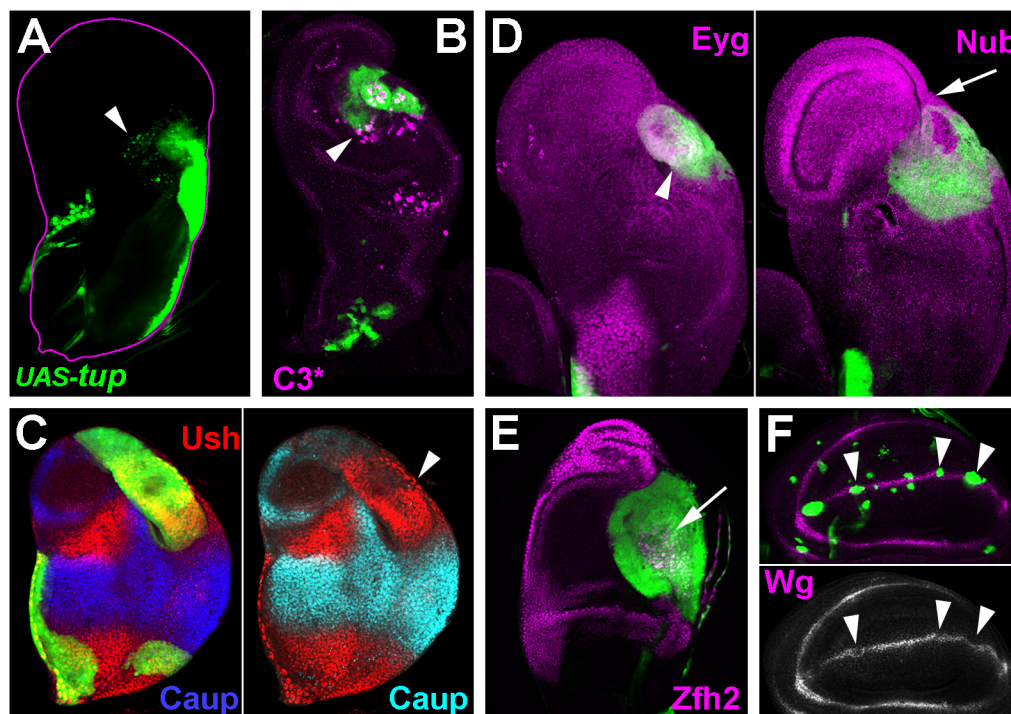
Figura R16. Efecto de la sobreexpresión de *UAS-tup* con distintas líneas Gal4. (A) Vistas dorsal (izquierda) y lateral (derecha) de un mismo individuo *MD638; UAS-tup*. El notum está duplicado simétricamente, a expensas del ala. Todos los individuos presentan este fenotipo a 25°C, aunque las duplicaciones pueden ser parciales. (B) Dos individuos *dpp^{disk}-Gal4/UAS-tup* (25°C). En (1) se producen duplicaciones parciales del notum (puntas de flecha blancas), simétricas (los ejes en línea discontinua) y a expensas del ala. En (2) se produce tejido ectópico de notum en la axila dorsal (flecha) y la mesopleura (punta de flecha negra), pero el ala permanece (flecha blanca), aunque reducida y con el patrón alterado. A 29°C, todos los individuos presentan el fenotipo mostrado en (1). (C) Individuo *ptc^{559.1}-Gal4/UAS-tup* (17°C), en el que se produce una duplicación parcial de notum. (D) Individuo *vg-Gal4; UAS-tup* (25°C). La tégula (tg) está engrosada y el margen del ala desaparece (flecha), pero el ala permanece, aunque reducida (fuera de la imagen). (E) Duplicaciones de notum que se producen en mutantes *wg*. Izquierda, esquema de un heminotum silvestre. En verde, posición y orientación de las macroquetas (círculos con flecha) y los campos de microquetas (flecha ancha) del notum endógeno. En morado, lo mismo para el duplicado. En (a), duplicación completa (como en el panel A). En (b), duplicación del



R17.B). En los clones se activaba la expresión de *eyg* y *ush* (Fig. R17.C-D), y la de *ara/caup* se alteraba a consecuencia del efecto no autónomo, pero quedaba inalterada o reprimida dentro de los clones (Fig. R17.C). Estos clones podían expresar *zfh-2*, aunque normalmente no expresaban ni *zfh-2* ni *nub* (Fig. R17.D-E y datos no mostrados).

Los clones *UAS-tup* inducidos en el segundo o tercer estadio no alteraban prácticamente el patrón de expresión de *ush*, *ara/caup* ni *zfh-2* (datos no mostrados), aunque sí el de *wg*, cuya expresión en el margen del ala desaparecía (Fig. R17.F). Este efecto en la expresión de *wg*, que también se observaba con líneas Gal4 tardías (C765; Fig. R18.G''), podría indicar que las duplicaciones de notum observadas con líneas Gal4 tempranas no son transformaciones auténticas del ala en notum, sino la adopción por defecto del destino de notum que ocurre cuando el ala, o parte de ella, no llega a especificarse por la falta de *wg* (Ng y cols., 1996; Rodríguez, 2004).

Figura R17. Efecto de la sobreexpresión de *UAS-tup* en clones. Clones *UAS-tup* (*act-Gal4*, 24-48 h DDH). (A) Células de un clon que crece en el territorio de ala se desprenden del clon (punta de flecha). El plano focal es basal. Morado: contorno del disco. (B) Un clon que crece en el territorio del ala deforma el disco y produce apoptosis (marcada con Caspasa 3 activada, morado, punta de flecha). (C) Un disco en el que los territorios de ala y axila están muy reducidos por efecto de un clon distal que expresa *ush* (punta de flecha, rojo) pero no *ara/caup* (azul). (D) Dos planos focales de un disco con un clon que produce una reducción del territorio de ala (marcado con *nub*, morado a la derecha) y la expresión ectópica de *eyg* (morado a la izquierda). (E) Clon en el que persiste la expresión de *zfh-2* (morado, flecha). (F) Clones tardíos en los que desaparece la expresión de *wg* (morado o blanco) del margen del ala (puntas de flecha).

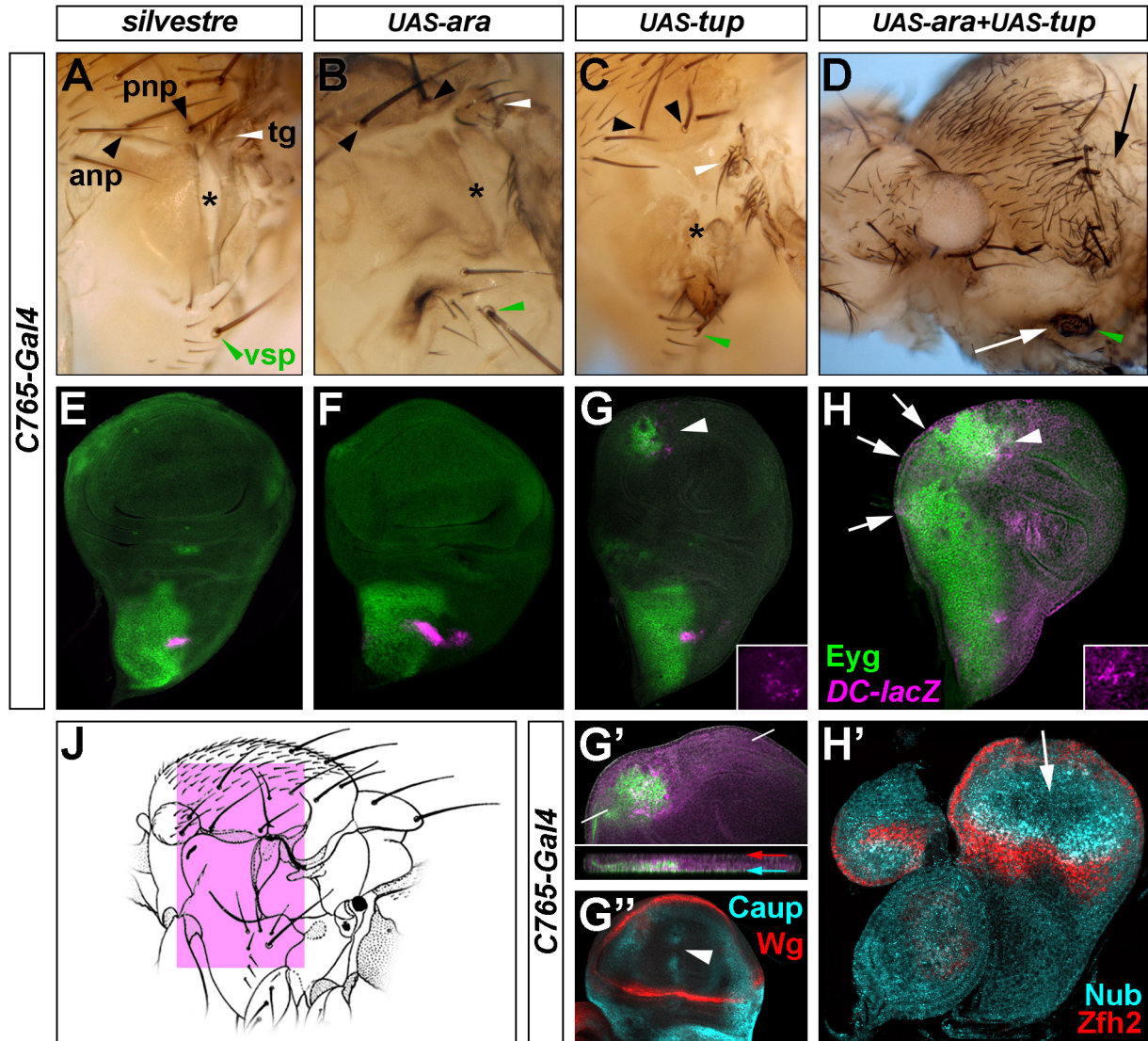


R5-2 La sobreexpresión conjunta de *tup* y *ara* produce eficientemente tejido ectópico de notum

El efecto de la sobreexpresión de *UAS-tup* con líneas Gal4 tempranas es similar al de la sobreexpresión de *UAS-ara* (Aldaz y cols., 2003; Diez del Corral, 1998; Wang y cols., 2000). También del mismo modo, la sobreexpresión de *UAS-ara* interfiere con la expresión de *wg* (Diez del Corral, 1998), por lo que las duplicaciones de notum que se obtienen por la sobreexpresión de *UAS-ara* se han atribuido a la falta de Wg (Diez del Corral, 1998). Esta circunstancia contrasta con el requerimiento absoluto del C-Iro para la correcta especificación del notum. Por tanto, decidí comprobar si *tup* podría estar colaborando con el C-Iro en el desarrollo del notum. Comparé la capacidad para inducir el desarrollo de tejido de notum de cada gen por separado y de ambos juntos, pero de modo que no interfiriesen con la especificación del territorio de ala.

La línea Gal4 C765 parecía adecuada para estudiar el efecto de las sobreexpresiones de *tup* y *ara*, pues tiene una expresión ubicua, relativamente tardía y suave en todos los discos imaginales (Gómez-Skarmeta y cols., 1996), y al sobreexpresar con ella dos antagonistas de la señalización de *wg*, *UAS-Axin* y *UAS-dTCF^{ΔN}*, no se producen duplicaciones de notum (datos no mostrados y Fig. S5.A). La sobreexpresión de *UAS-tup* reduce el tamaño del ala, pero lo más interesante es que induce la aparición de

Figura R18. Capacidad relativa de *UAS-ara*, *UAS-tup* y de ambos a la vez para imponer la identidad de *notum* (C765). Los genotipos se indican en la figura. En A-D y J, la parte anterior queda a la izquierda. (A-D) Visión de las pleuras de individuos adultos, equivalente a la del dibujo en J. Las puntas de flecha negras apuntan a las macroquetas ANP y PNP, la blanca a la tégula y la verde a la macroqueta vertical esternopleural (VSP) en todos los paneles. En D, la flecha negra indica una extensión lateral del tejido de *notum*, y la ausencia de la axila y el ala, y la flecha blanca indica un sobrecrecimiento pleural similar al que se aprecia en C. Las sobreexpresiones se realizaron a 25°C, salvo la mostrada en D, que fue a 17°C. (E-G',H) Discos que muestran la expresión de *eyg* (verde) y *DC-lacZ* (morado). En G, la expresión de estos marcadores se detecta en el territorio de pleura (punta de flecha, ampliado en el recuadro para *DC-lacZ*). En H, la expresión de *eyg* se expande por la región de la axila dorsal, lateral y ventral (flechas) y la pleura (punta de flecha), donde también se detecta *DC-lacZ* (ampliado en el recuadro). En G', vista de la región de la pleura y proyección en el eje Z indicada por las líneas blancas. El territorio que expresa *eyg* y *DC-lacZ* es el de pleura, en el plano de la membrana peripodial (flecha azul). Flecha roja, plano del disco propio. (G'') Expresión de *wg* (rojo), que desaparece en el margen del ala (punta de flecha) y *ara/caup* (azul), que prácticamente no se altera. (H') Expresión de *zfh-2* (rojo) y de *nub* (azul). Ambos marcadores se expresan en un patrón menos homogéneo que en el silvestre. (J) En morado, vista lateral mostrada en A-D. Modificado de Ferris (1965).



un abultamiento en la región de la pleura que, por su pigmentación y las microquetas que presenta, parece tejido de *notum* (Fig. R18.C, comparar con A). Este abultamiento no se produce mediante sobreexpresión de *UAS-ara* (Fig. R18.B). En cambio, cuando se sobreexpresan conjuntamente *UAS-tup* y *UAS-ara*, el efecto es mucho más potente, incluso realizando la sobreexpresión a menor temperatura. Además del abultamiento en la región pleural, la axila y el ala han desaparecido, y en su lugar se encuentra una gran extensión de tejido con obvia identidad de *notum*, que conecta con el tejido de *notum* propio y se extiende hacia la región ventral (Fig. R18.D). Además, esta

coexpresión parece extender el tejido de cápsula cefálica a costa del ojo (Figs. R18.D y S5.D), cosa que no ocurre en las sobreexpresiones aisladas de *UAS-tup* y *UAS-ara* (Fig. S5.B-C).

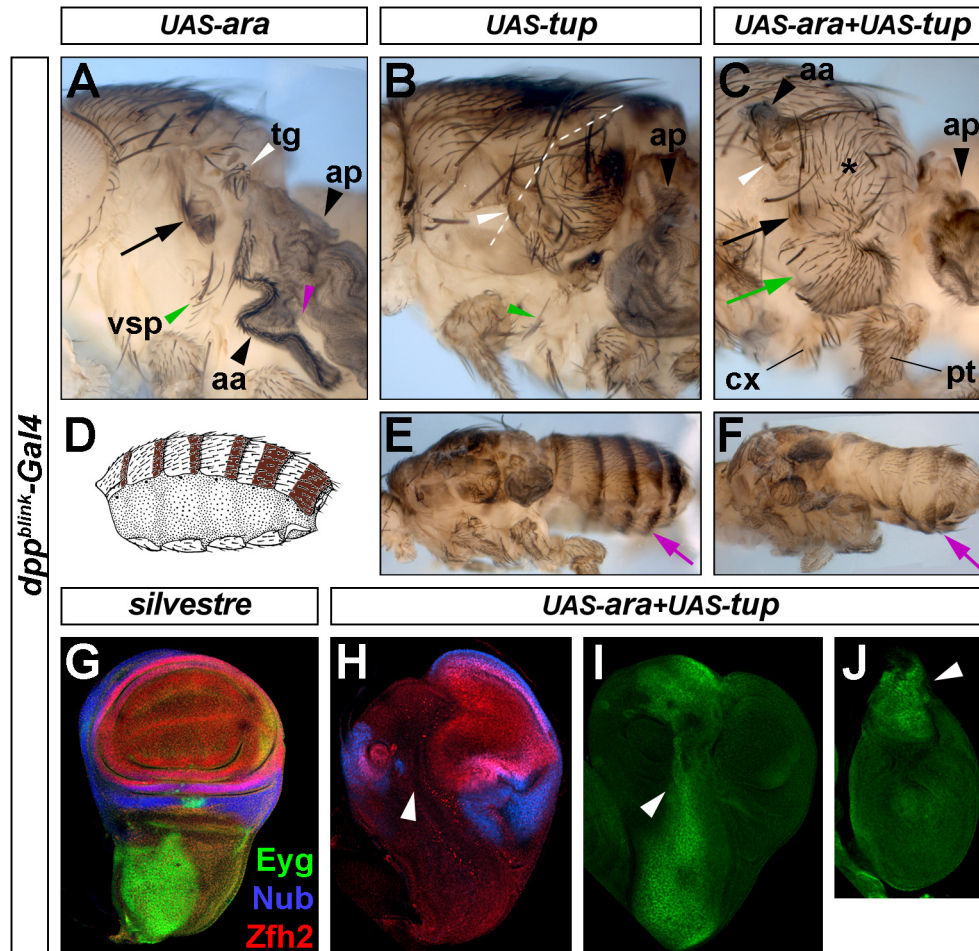
Verifiqué que estas transformaciones se podían reconocer en discos imaginales. En discos de tercer estadio, la sobreexpresión aislada de *UAS-tup*, pero no la de *UAS-ara*, inducía la expresión de *eyg* en la región de la pleura y la activación de la línea *DC-lacZ* en algunas de estas células (Fig. R18.E-G'). En los discos en los que se coexpresaban *UAS-ara* y *UAS-tup*, la expresión de *eyg* y la activación del regulador-cis DC se extendían ampliamente por la región de la axila dorsal, ventral, la pleura y parte del ala (Fig. R18.H). En consonancia con esto, la expresión de *nub* y de *zfh-2* estaban reducidas (Fig. R18.H').

La línea *dpp^{blk}-Gal4* se expresa según el patrón de *dpp* en los discos imaginales (Morimura y cols., 1996; Staehling-Hampton y cols., 1994), y por tanto su actividad en el territorio de ala es temprana. La sobreexpresión de *UAS-tup* con esta línea tiene un rango de fenotipos, que va desde la eliminación de la región central del ala y la formación de un abultamiento en la pleura similar al obtenido con la línea C765 (datos no mostrados), hasta una duplicación de notum a costa de la parte anterior del ala (Fig. R16.B). Este fenotipo no se exagera por sobreexpresión simultánea con *UAS-ara* (Fig. R19.C, comparar con B y con Fig. R16.B), y el efecto de *UAS-tup* y de *UAS-tup+UAS-ara* altera la expresión de diversos marcadores en el disco de manera similar (Fig. R19.H-I, comparar con Fig. R16.F-I). La sobreexpresión aislada de *UAS-ara* elimina parte del tejido central del ala, y en ocasiones produce el bulto de tejido notal en la pleura (Fig. R19.A). Por tanto, en el ala no parece observarse un efecto sinérgico de la coexpresión de *UAS-tup* y *UAS-ara* con esta línea Gal4. Pero como su expresión es temprana en la región del ala, y los fenotipos pasan de la eliminación de tejido a la duplicación del notum a costa del ala, estos efectos podrían atribuirse a una interferencia con la actividad formadora de ala de Wg. En el esternopleurito en cambio, sí se observó un efecto cooperativo: *UAS-tup* y *UAS-ara* por separado apenas tienen efecto en esta región, pero la sobreexpresión simultánea de *UAS-tup* y *UAS-ara* produce un abultamiento con atributos de tejido notal, similar al que se puede obtener en la pleura (Fig. R19.C). Esta región anatómica deriva del disco mesotorácico de pata, en el que esta sobreexpresión produce la expresión ectópica de *eyg* en la región correspondiente del disco (Fig. R19.J).

En el abdomen, tanto la coexpresión de *UAS-tup* y *UAS-ara*, como la de *UAS-tup* aisladamente con la línea *dpp^{blk}-Gal4* producen una aparente transformación de los esternitos en terguitos, a juzgar por la pigmentación y la aparición de microquetas (Fig. R19.E-F). (En el caso de la expresión simple de *UAS-tup*, la penetrancia de este fenotipo en el abdomen era menor, y con *UAS-ara* no se producía.)

Estos fenotipos de ganancia de función sugieren que *tup* y el C-Iro actúan sinérgicamente durante la especificación del notum. Esto podía indicar que *tup* y el C-Iro operan de manera dependiente. Para explorar esta posibilidad quise comprobar

Figura R19. Capacidad relativa de *UAS-ara+UAS-tup* para imponer la identidad de notum (*dpp^{disk}-Gal4*). Los genotipos se indican en la figura. En A-F, la parte anterior queda a la izquierda (A-C) Vista lateral del tórax de individuos adultos. La tégula (tg) y la cerda vertical esternopleural (vsp) se indican como en la Fig. R18. aa y ap, ala anterior y posterior (puntas de flecha negras). Las flechas negras indican un sobrecrecimiento de tejido de notum en la región mesopleural. En A, la punta de flecha morada indica la falta de tejido en la zona central del ala. En B, la línea discontinua indica el eje de simetría del notum duplicado (ver Fig. R17). En C, el asterisco marca una porción de tejido de notum en la zona de la esternopleura, un derivado del disco de pata. cx, coxa. pt, pata. (D) Vista lateral del abdomen adulto silvestre. Tomado de Ferris (1965). (E-F) Vista lateral del tórax y abdomen de individuos adultos. La flecha morada señala los esternitos, que se han transformado a terguitos. La penetrancia de este fenotipo sólo era completa en la combinación *UAS-ara+UAS-tup*. (G-J) Patrón de expresión de *eyg* (verde), *nub* (rojo) y *zfh-2* (azul) de los genotipos indicados. En J, disco de pata mesotorácico (dorsal hacia arriba). Las puntas de flecha indican el territorio de sobreexpresión, donde se adquiere la expresión de *eyg* y se pierde la de *nub* y *zfh-2*.



si se producían interacciones genéticas entre mutaciones de pérdida de función de *tup* y del C-Iro durante la especificación del notum. Sin embargo no observé ningún efecto al reducir simultáneamente la función de *tup* y el C-Iro en varias combinaciones hipomorfas y nulas transheterozigotas (Tabla S1). Esto podía deberse a que efectivamente no se produce tal interacción, o a que las condiciones mutantes no eran lo suficientemente fuertes. Pero la deficiencia completa del C-Iro (*iro^{DFM3}*) sí parece ser un fondo sensible a la especificación del notum, ya que en condiciones transheterozigotas con mutaciones de la vía de señalización del EGFR, se observan fenotipos de pérdida de identidad del notum (Fig. S6.A-D).

R6 *tup* participa en la formación del patrón de órganos sensoriales del tórax y de la cápsula cefálica dorsal

Biryukova y Heitzler (2005) han descrito a *tup* como un miembro del prepatrón que controla la expresión de *ac/sc* y, por tanto, la formación de las macroquetas del notum. Según estos autores, los mutantes hipomorfos de *tup* (*tup^{E20}*, *tup^{d03613}*) presentan un exceso de macroquetas DC y SC, y en los clones nulos que crecen cerca de estas posiciones aparecen quetas ectópicas. Así, *tup* aparece como antagonista de la formación de macroquetas. Este efecto sería, según estos autores, debido a su capacidad de unirse a Chip y Pnr. Estas uniones impedirían la conexión que estos factores establecen entre los elementos reguladores-cis correspondientes y los promotores de *ac/sc* (Biryukova y Heitzler, 2005), conexión necesaria para la correcta expresión de los genes proneurales (Romain y cols., 2000). Sin embargo, mis observaciones indican que la falta de *tup* produce fenotipos adicionales, que este modelo no puede explicar satisfactoriamente.

Tabla R4. Efecto de los clones^(‡) *tup^{ex4}* en el patrón de macroquetas del notum.

Posición con macroqueta	Número de clones por posición	Número de casos con exceso de quetas (promedio de cerdas por posición)	Número de casos con quetas sólo y, y más y ⁺ , o sólo y ⁺ ^(¶)			Posiciones con falta de macroqueta
			y	y más y ⁺	y ⁺	
PS	72	6 (2.00±0.00)	2	4	0	0
ANP	83	3 (2.00±0.00)	2	1	0	0
PNP	72	1 (2.00±0.00)	1	0	0	0
ASA	46	15 (2.13±0.35)	3	9	3	0
PSA	77	25 (2.04±0.20)	8	15	2	5
APA	6	0	0	0	0	6
PPA	11	5 (2.20±0.40)	0	1	4	6
ADC	63	17 (2.00±0.00)	0	11 ^(§)	6	3
PDC	52	28 (1.97±0.20)	0	4	24	3
SC	167	154 (2.18±1.00) ^(#)	51	76	27	0

‡ - Se trata de los clones inducidos a 72-96h DDH cuantificados en la Tabla R2.

¶ - Se trata de clones en cuya cercanía se formó una macroqueta y⁺.

§ - En alguno de estos casos, la macroqueta silvestre era la correspondiente al patrón endógeno, mientras que la mutante era ectópica.

- Estos números incluyen el efecto de los clones que afectaban a las quetas ASC, PSC y de 43 clones más fuera de estas posiciones en los que se formaban quetas, 27 de ellos con una única queta ectópica.

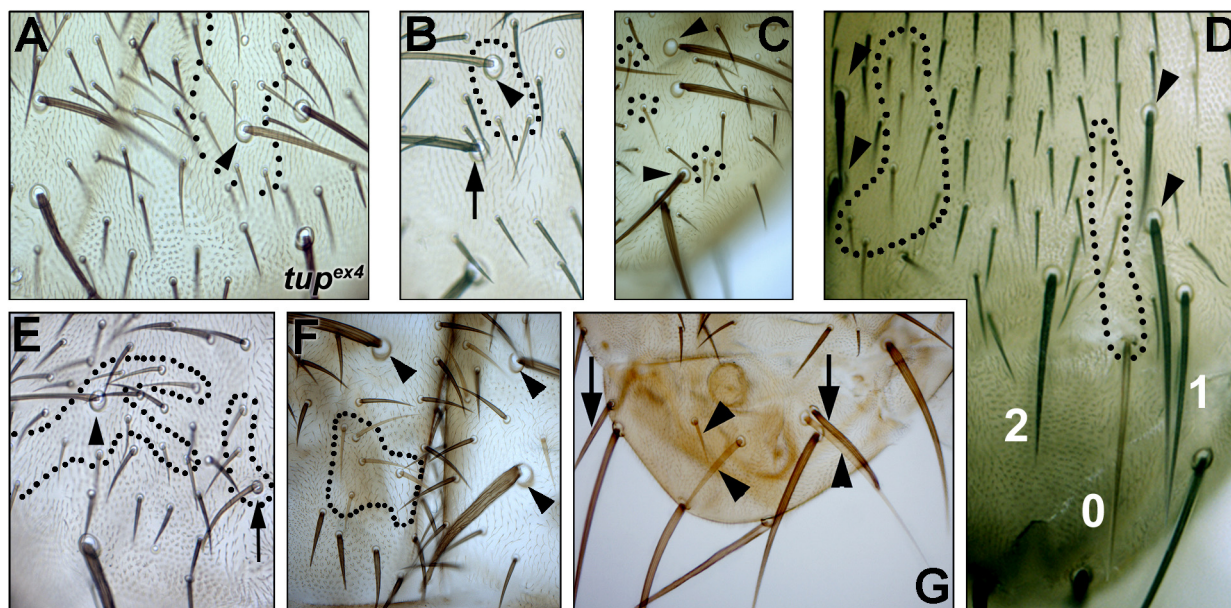


Figura R20. Fenotipos adultos asociados a la falta de *tup* (III). Alteraciones del patrón de órganos sensoriales en clones nulos. Los clones son *y* *tup*^{ex4} (72-96 h DDH) en todos los paneles. (A) Macroqueta ectópica (punta de flecha) formada dentro de un clon (contorno de puntos) en la región DC. (B) Macroqueta formada en un clon (contorno de puntos) en la posición típica de la ADC (punta de flecha). Entre la posición ADC y PDC, aparece una cerda adicional, ectópica, en territorio silvestre. (C) Dos macroquetas ectópicas formadas en territorio silvestre (puntas de flecha), quizás por efecto de clones adyacentes, que sólo producen microquetas (contornos de puntos). (D) Dos clones (contornos de puntos) adyacentes a las posiciones DC (puntas de flecha) producen bien el desplazamiento de la PDC (derecha), bien la formación de tres macroquetas ectópicas, cada una con diferentes dosis de *tup* (0, en el clon mutante, 1 en el territorio heterocigótico y 2 en el clon gemelo). (E) Un clon genera una ADC mutante (punta de flecha), mientras otro cercano produce una macroqueta ectópica lejos de la región DC. (F) Un clon mutante elimina la PDC. No se producen cerdas ectópicas. (G) Varios clones en el escutelo producen cerdas adicionales tanto mutantes (puntas de flecha) como silvestres (flechas).

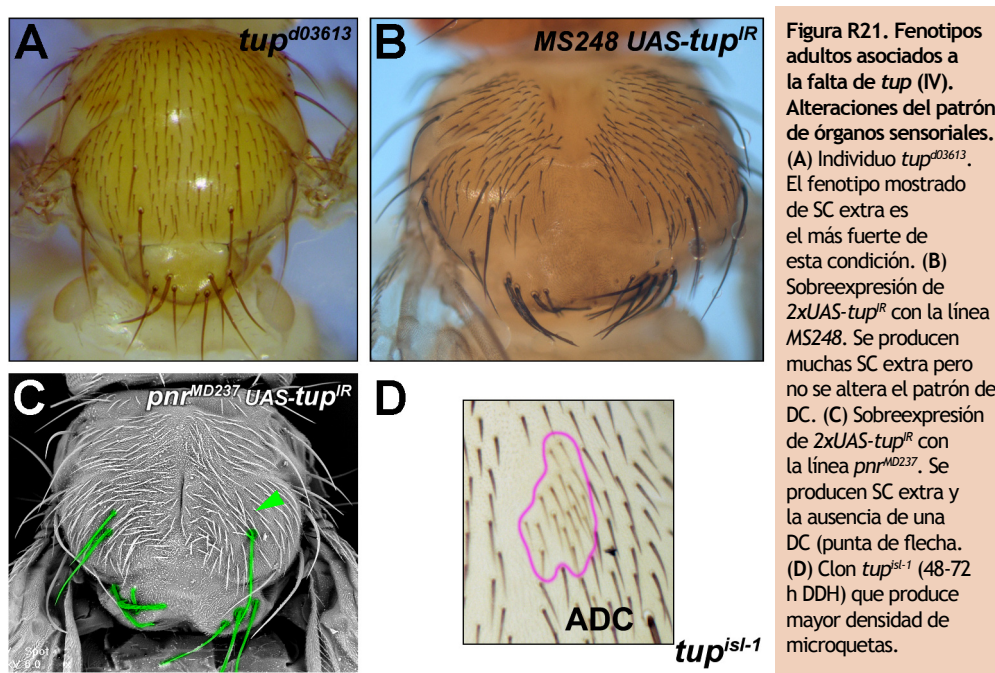
R6-1 *tup* tiene un efecto complejo en el patrón de macroquetas

Para estudiar la función de *tup* sobre la formación del patrón de órganos sensoriales, examiné el efecto de clones *tup*^{ex4} inducidos al principio del tercer estadio larvario y marcados por la mutación *y*. Algunos de los clones inducidos en este periodo aún presentan transformaciones parciales a tejido de axila (ver R3-1 y 2) así que, para evitar problemas de interpretación en este capítulo, no se tuvieron en cuenta los clones que mostraran simultáneamente efectos en el patrón de macroquetas y lesiones que pudieran alojar sensilas propias de la axila (depresiones y remolinos, principalmente). Los efectos eran más frecuentes en las posiciones más posteriores (Fig. R5.H), lo que se correlaciona con la evolución del patrón de expresión de *tup* durante el tercer estadio larvario. La Tabla R4 resume los efectos observados, y su frecuencia, para cada macroqueta del notum.

Los clones *tup* podían producir macroquetas adicionales cerca de casi todas las posiciones (Tabla R4). Lo más común eran las duplicaciones, si bien en el escutelo un mismo clon podía generar más de dos órganos ectópicos (Fig. R20.G). Es importante destacar que las quetas supernumerarias podían aparecer no autónomamente (Tabla R4 y Fig. R20.B-D). De hecho, sólo en el 26% de las ocasiones (principalmente en la región SC) las duplicaciones ocurrían dentro del clon *y*, en el resto, las duplicaciones se componían de una cerda *y* *tup* más otra *y*⁺ *tup*^{-/+} (o *tup*^{+/+}, 48%, Fig. R20.A-B) o

aparecían exclusivamente de manera no autónoma (26%, Fig. R20.C). En concreto, en las cerdas DC nunca se observó una duplicación autónoma (dos cerdas *y tup* en la misma posición).

Aparentemente, la extensión de los clones no se correlacionaba con su capacidad para generar macroquetas adicionales: clones relativamente grandes podían ser inefectivos (Fig. R20.D-E), mientras otros más pequeños podían producir cerdas adicionales (Fig. R20.B-C). En ocasiones, los clones *tup* podían producir un desplazamiento de las cerdas de su lugar correcto (Fig. R20.D). Además, el efecto contrario, la desaparición del órgano sensorial, también podía producirse; en la posición APA, la eliminación de la macroqueta fue la norma, efecto que se observó con menor frecuencia en la PPA y las DC (Tabla R4 y Fig. R20.F).



Las condiciones hipomorfas para *tup* tuvieron efectos similares, si bien más suaves. Tanto el alelo hipomorfo viables *tup*^{d03613} (Fig. R21.A), como las sobreexpresiones de *UAS-tup*^{IR} con distintas líneas Gal4 (Fig. R21.B-C), afectaron casi únicamente a las macroquetas DC y SC, las más sensibles a la pérdida de *tup*. En la Tabla R5 se describe cuantitativamente el efecto de tres condiciones hipomorfas de *tup* sobre las cerdas DC y SC. Todas las condiciones aumentaron el número de macroquetas SC, mientras que el efecto sobre las DC fue diverso y más discreto: a menudo se veían las dos cerdas DC normales, pero incluso con la misma línea Gal4 podían verse tres o una sola (datos no mostrados y Fig. R21.C, ver Tabla R5).

Por regla general los órganos extra, independientemente de su genotipo, se formaban bien espaciados de los órganos silvestres y entre sí. Esto sugiere que la inhibición lateral mediada por la vía de N no se ve afectada por la falta de función de

Tabla R5. Efecto de condiciones hipomorfas de <i>tup</i> en el patrón de cerdas SC y DC.				
Genotipo	T (°C)	DC ^(¶)	SC ^(¶)	N ^(§)
<i>tup</i> ^{d03613}	25	2,00±0,00	2,40±0,55	30
<i>MS248 2xUAS-tup</i> ^{IR} ♀	29	2,00±0,35	4,34±1,10	50
<i>pnr</i> ^{MD237} <i>2xUAS-tup</i> ^{IR} + <i>UAS-LacZ</i>	25	1,41±0,50	2,98±1,04	54
<i>pnr</i> ^{MD237} <i>2xUAS-tup</i> ^{IR} + <i>UAS-pnr</i>	25	2,65±0,66	3,43±0,60	40
<i>pnr</i> ^{MD237} <i>UAS-pnr</i>	25	2,20±0,41	2,80±0,46	44

¶ - Media±(desviación típica).
§ - Número de heminotos contabilizados.

tup. Sin embargo, en el escutelo las cerdas adicionales podían aparecer prácticamente contiguas (Fig. R20.G y R21.C).

En cuanto a las microquetas, en una pequeña fracción de los clones inducidos al principio del tercer estadio (1,5-2%) se producía un aumento de la densidad de microquetas (Fig. R21.D) o defectos en la polaridad de las mismas (datos no mostrados). En clones inducidos más tempranamente, estos defectos de polaridad podían tomar la forma de un remolino integrado por microquetas mutantes y silvestres, que surgen frecuentemente alrededor de una lesión que puede albergar sensilas propias de la axila (Fig. R5.G).

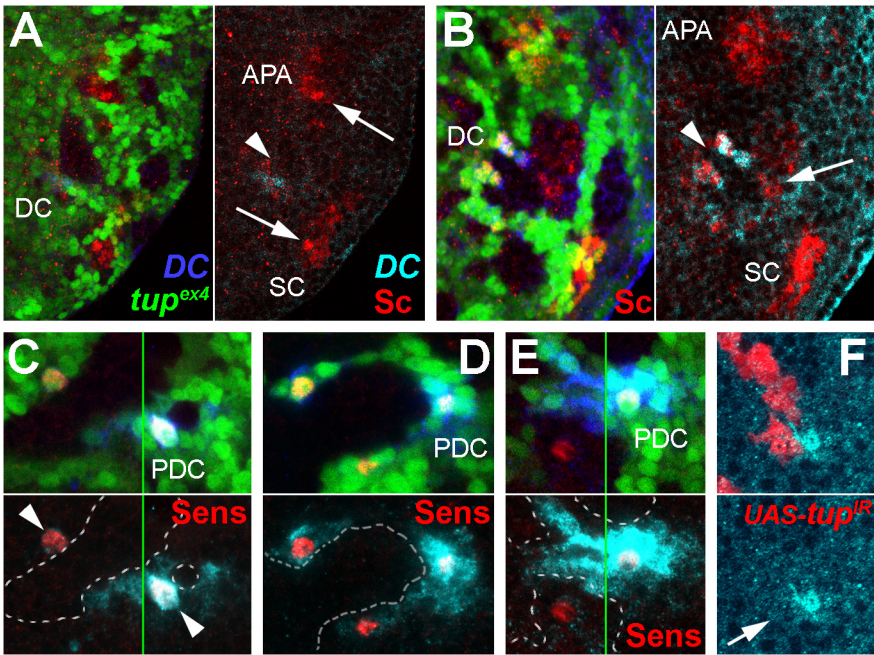


Figura R22. Efecto de la falta de *tup* en marcadores del desarrollo de las macroquetas. Clones *tup*^{ex4} inducidos 72-96 h DDH o con *MS248 UAS-Flp* (excepto F). (A) Vista de la región posterior de un notum. Los clones no afectan a la expresión de sc (rojo) en los grupos proneurales APA y SC (flechas), pero sí en el grupo DC (punta de flecha) y a la actividad de su regulador-cis (azul en todos los paneles). (B) Otro ejemplo del efecto anterior (punta de flecha), en el que permanece algo de expresión de sc (rojo, flecha) donde ha desaparecido la actividad del regulador-cis *DC-lacZ*. (C) Un clon deja aislada a una célula silvestre del grupo DC, que adquiere el destino de la CMOS ADC. (D) Un clon deforma el grupo DC, que queda en forma de herradura y forma tres CMOS DC, en territorio silvestre. (E) Un clon forma una CMOS que queda fuera del territorio donde el regulador-cis DC está activo. (F) Clon *2xUAS-tup*^{IR} (*act-Gal4*, 72-96 h DDH) en el que también se pierde la actividad del regulador-cis DC.

R6-2 *tup* es necesario para la actividad del regulador-cis dorsocentral

El modelo propuesto por Biryukova y Heitzler (2005), según el cual *Tup* atenuaría la función de *Pnr* y *Chip* en la activación de los reguladores-cis del C-AS, sólo podría explicar la aparición autónoma de macroquetas adicionales. En cambio, la aparición no autónoma de órganos supernumerarios y la desaparición ocasional de los órganos silvestres en territorio mutante quedan sin explicar.

Para intentar aclarar estos fenotipos, me centré en los efectos sobre las macroquetas DC y su elemento regulador, puesto que éstas muestran todo el espectro de fenotipos *tup* y los mecanismos genéticos que dirigen su formación son los mejor conocidos (Biryukova y Heitzler, 2005; García-García y cols., 1999; Heitzler y cols., 2003; Romain y cols., 2000; Tomoyasu y cols., 1998; Vanolst y cols., 2005). El principal activador de la expresión de *ac/sc* en la región DC es *pnr* (García-García y cols., 1999). Mis datos sugieren que *tup* se requiere hasta el tercer estadio para la correcta expresión de *pnr*, en concreto en la región distal del dominio de *pnr* (ver R3-2, Figs. R10. By R11.A), que es donde este factor activa al regulador-cis DC del C-AS (García-García y cols., 1999). Por tanto, quise comprobar si la pérdida de *tup* podría afectar al funcionamiento de este regulador-cis; Biryukova y Heitzler (2005) ya habían descrito que los mutantes hipomorfos de *tup* tenían el regulador-cis sobreactivado y que la sobreexpresión de *UAS-tup* reducía su actividad. En cambio, mis observaciones fueron otras: los clones de alelos nulos de *tup* o de condiciones hipomorfas (sobreexpresión de $2 \times UAS-tup^{IR}$) pierden la actividad del regulador-cis DC (Fig. R22) y, consecuentemente, la expresión de *sc* se reduce en los clones que crecen en la región dorsocentral (Fig. R22.A-B). La expresión de *sc* en la región escutelar, en cambio, no parece alterada por efecto de los clones (Fig. R22.A). Examinando el efecto de los clones *tup* en la expresión del marcador *DC-lacZ* y de Senseless (*Sens*, que marca de las CMOS; Nolo y cols., 2000) simultáneamente, se observa que las CMOS DC pueden desplazarse por efecto de

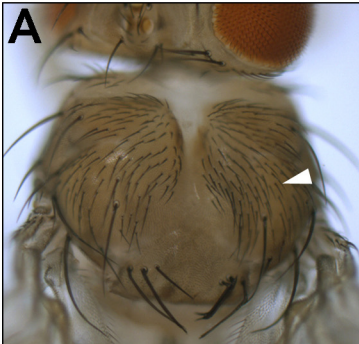
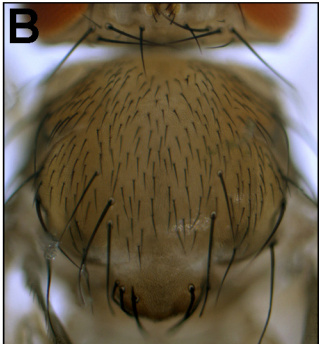

	$2 \times UAS-tup^{IR} + UAS-lacZ$	$2 \times UAS-tup^{IR} + UAS-pnr$	$TM6b / UAS-pnr$
A			
pnr^{MD237}-Gal4			
DC	1,4±0,5	2,7±0,7	2,2±0,4
SC	3,0±1,0	3,4±0,6	2,8±0,5
N	54	40	44

Figura R23. Análisis de epistasia entre *tup* y *pnr* en la formación de las cerdas DC. Los genotipos se indican en la figura. (A-C) Nota de adultos que muestran el fenotipo de distintas sobreexpresiones a 25°C. Debajo de cada imagen, el número medio y la desviación típica de las cerdas DC y SC de cada genotipo y el n° de heminota empleados para realizar el cálculo. Estos datos también se indican en la Tabla R5.

los clones (Fig. R22.C) o producirse adicionalmente de manera no autónoma. Esto último ocurre cuando la localización de un clon, y la consiguiente inhibición del regulador-cis DC, imponen un cambio morfológico drástico al grupo proneural (Fig. R22.D). En cuanto a las CMOS que se producen dentro de los clones, éstas se forman fuera del territorio de actividad del *DC-lacZ* (Fig. R22.E). Por tanto, la aparición de las macroquetas mutantes no parece responder a las directrices normales del prepatrón.

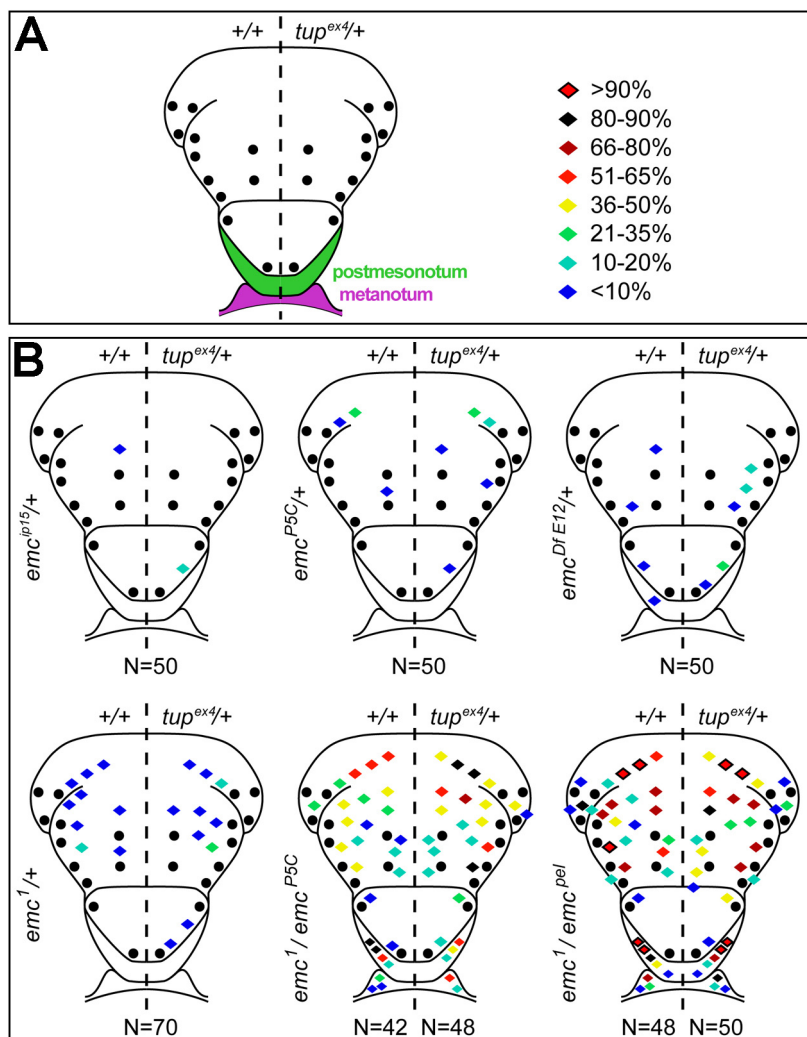
La activación del regulador-cis DC requiere la expresión de *pnr*, y ésta a su vez requiere la función de *tup*. Por tanto, estudié la capacidad de *UAS-pnr* para rescatar el fenotipo que produce la sobreexpresión de *UAS-tup^{IR}* en las cerdas DC y SC (Tablas R3 y R5). Sin embargo, dirigiendo la expresión de estos transgenes con la línea *pnr^{MD237}-Gal4* sólo se rescata correctamente el defecto de cierre torácico (Fig. R23.A-C). En efecto, la sobreexpresión de *UAS-tup^{IR}* produce una ligera tendencia a perder cerdas DC (Fig. R23.A, punta de flecha), pero cuando se sobreexpresa simultáneamente con *UAS-pnr* aparecen cerdas supernumerarias en la regiones DC y SC, y además en mayor número que con la sobreexpresión simple de *UAS-pnr* (Fig. R23.A-C y Tabla R5). Por tanto, parece que la reducción de la función de *tup* facilita la actividad de Pnr en la formación de quetas DC. Este efecto concuerda con el modelo de Biryukova y Heitzler de inhibición de la actividad de Pnr por Tup. Esto podría explicarse si *tup* tuviera un doble efecto sobre la función de *pnr*. Por un lado regularía positivamente la expresión de *pnr* (para lo que bastaría con un poco de actividad y por tanto esta función sólo se detectaría en clones nulos para *tup*) y después interfiriendo con la actividad de Pnr a través del modelo descrito por (Biryukova y Heitzler, 2005) (para lo que la cantidad correcta de Tup sería crítica, y una reducción bastaría para producir defectos en el patrón DC).

R6-3 *tup* interacciona genéticamente con *emc* y *gbb*

La aparición en los clones *tup* de cerdas ectópicas en la región DC no se puede explicar por un aumento de la actividad de los reguladores-cis del C-AS, así que exploré otras posibles explicaciones. Los clones mutantes *tup* promueven la formación de quetas en el metanotum (Fig. R6.B), donde no aparecen órganos sensoriales en el individuo silvestre (Cole y Palka, 1982; Ouweneel y van der Meer, 1973). Mutantes hipomorfos de *emc* forman órganos sensoriales adicionales en diversas partes del cuerpo, incluido el metanotum (Botas y cols., 1982; García-Alonso y García-Bellido, 1988; Moscoso del Prado y García-Bellido, 1984), así que examiné la posibilidad de que *tup* interaccionara genéticamente con *emc*. En efecto, las mutaciones nulas para *tup*, que en heterozigosis no producen alteraciones del patrón de quetas, agravan claramente el fenotipo de diversas combinaciones alélicas de *emc*, al menos en la región escutelar (Fig. R24.A-B). Esto sugiere la posibilidad de que *tup* se requiera para la correcta función de *emc*, quizá regulando positivamente su expresión.

El factor difusible *gbb*, homólogo del gen de la activina de vertebrados (Doctor y

Figura R24. Interacción genética entre *tup* y *emc*.
(A) Esquema del patrón de cerdas del notum. En verde y morado, el postnotum y el metanotum, respectivamente, que no tienen quetas en el individuo silvestre. **(B)** Fenotipos obtenidos en diferentes combinaciones mutantes de *emc* con *tup*. En cada tórax, la mitad izquierda representa el fenotipo de la combinación alélica de *emc*, y la mitad derecha el fenotipo de esa combinación en fondo heterocigótico *tup^{ex4}/+*. N es el número de heminota observados para contabilizar el fenotipo. Las cerdas ectópicas se indican con rombos, y las posiciones normales, con círculos. El código de colores indica la penetrancia de la aparición de quetas en distintas posiciones.



cols., 1992; Wharton y cols., 1991), se expresa en el notum en un dominio aparentemente incluido en el de la expresión de *tup* (Khalsa y cols., 1998). Algunos individuos supervivientes de la combinación hipomorfa *gbb¹/gbb⁴* presentan una duplicación de las cerdas ASC (Wharton y cols., 1999). Este fenotipo asociado a mutantes para un factor difusible, junto con los fenotipos no autónomos de los clones *tup*, me

Tabla R6. Interacción genética entre *tup* y *gbb* (§).

Genotipo	+	<i>tup^{ex4}</i> , +	+, <i>gbb⁴</i>	+, <i>gbb¹</i>
+	0% (100)	0% (74)	0% (100)	2% (92)
<i>tup^{ex4}</i> , +		-	10% (80)	20% (74)
+, <i>gbb⁴</i>			-	50% (44)
+, <i>gbb¹</i>				-

§ - La interacción se contabilizó por el porcentaje de heminota (en negrita) que presentaron la duplicación de la macroqueta ASC. Este fenotipo se produce en combinaciones hipomórficas fuertes de *gbb* (Wharton y cols., 1999). Entre paréntesis, el número de heminota contabilizados.

indujeron a comprobar si había una interacción genética entre *tup* y *gbb*. En efecto, los transheterozigotos de estas mutaciones y *tup^{ex4}* presentan una clara interacción con relación a este fenotipo (Tabla R6).

La relevancia de estas interacciones aún está por determinar. Su esclarecimiento podría ayudar a entender algunos de los efectos que la pérdida de *tup* tiene sobre el patrón de órganos sensoriales, y que de momento no se explican ni con el modelo propuesto por Biryukova y Heitzler (2005) ni por lo expuesto en la sección R6-2.

R7 Regulación de la expresión de *tup*

R7-1 La vía del EGFR no afecta a la expresión de *tup*

La ruta de señalización del EGFR está activa en la región proximal del disco dorsal de mesotórax desde al menos el segundo estadio larvario (Simcox y cols., 1996; Wang y cols., 2000). Esta vía activa la expresión de *ap* y del C-Iro, y se requiere para el crecimiento del primordio de notum (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990; Simcox, 1997; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b). Por tanto, dados el requerimiento de *tup* para la especificación del notum y su patrón de expresión temprano, la vía del EGFR parecería una buena candidata a ser un regulador positivo de la expresión de *tup*. Sin embargo, este no es el caso. Eliminando la actividad de la ruta en clones nulos para *egfr*, la expresión de *ara/caup* se pierde, pero la de *tup* se mantiene inalterada o incluso aumentada (Fig. R25.A-B). En clones nulos para *ras85D* (transductor de la vía) o *pnt* (efector de la vía en el notum; Letizia y cols., 2007), ambas condiciones de fuerte inhibición de la señalización por el EGFR, la expresión de *ara/caup* desaparece o se reduce, mientras que la de *tup* permanece (Fig. R25.C-D), incluso cuando el crecimiento del notum está comprometido (datos no mostrados). Tampoco la sobreexpresión de los inhibidores (en distintos puntos de la vía) *UAS-aos* o *UAS-Raf^{DN}* afectan a la expresión de *tup* (datos no mostrados). Asimismo la activación constitutiva de la vía mediante la sobreexpresión de *UAS-Ras1^{V12}* puede activar la expresión ectópica de *ara/caup*, principalmente en la axila y en la pleura (Fig. R25.E), pero no lo hace con la de *tup* salvo en algunos de los clones inducidos tempranamente (Fig. R25.F). Estos clones probablemente se han transformado en territorio de notum por efecto de la activación temprana de la vía del EGFR (Wang y cols., 2000). La sobreexpresión de *pnt* o del ligando del receptor en esta región, *vn* (Simcox, 1997; Wang y cols., 2000) mediante la sobreexpresión de *UAS-vn*, *UAS-pntP1* ó *UAS-pntP2*, tampoco tuvieron efecto en la expresión en *tup* (no mostrado).

Los resultados anteriores permiten concluir que la expresión de *tup* no depende de la ruta del EGFR durante el tercer estadio larvario. Pero estos datos no permiten descartar que la expresión de *tup* dependa de la vía del EGFR en momentos anteriores,

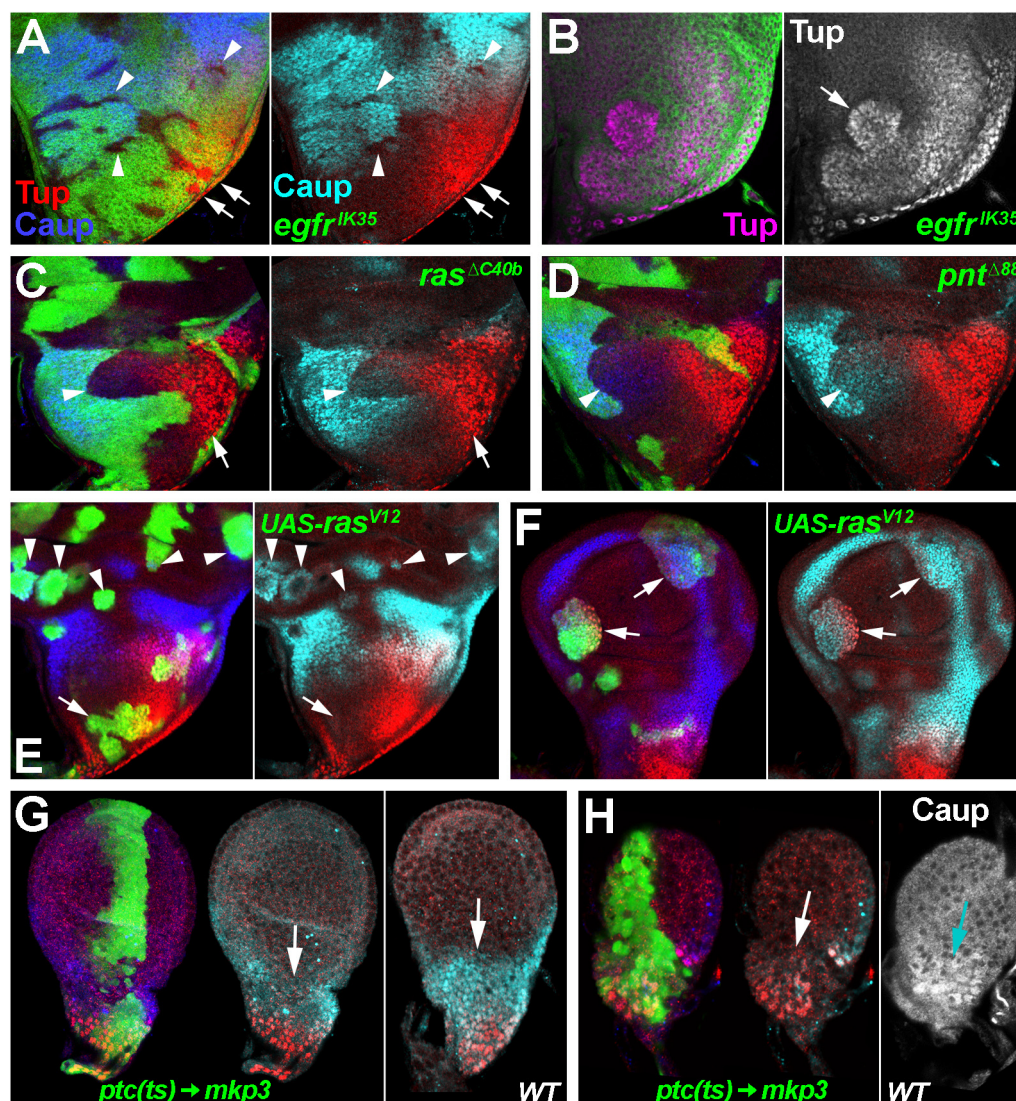


Figura R25. La expresión de *tup* es independiente de la señalización del EGFR. (A-B) Clones nulos para el EGFR (48-72 h DDH en fondo M⁺), en los que se pierde (puntas de flecha en A) la expresión de *ara/caup* (azul o blanco en todos los paneles) y se mantiene o incluso aumenta (flechas en A y B) la expresión de *tup* (rojo en todos los paneles). (C) Clones nulos para *ras85D* (48-72 h DDH en fondo M⁺) en los que se pierde o reduce la expresión de *ara/caup* (punta de flecha) y se mantiene la de *tup* (flecha). (D) Clones nulos para *pnt* (48-72 h DDH en fondo M⁺) en los que se mantiene la expresión de *tup*, pero no la de *ara/caup* (puntas de flecha). (E) Clones *UASDras^{V12}* (*act-Gal4*, 48-72 h DDH). Algunos de ellos expresan ectópicamente *ara/caup* en el territorio de axila (puntas de flecha), pero no *tup*, o sólo muy ligeramente. Tampoco en el notum estos clones activan la expresión de *tup* fuera de su dominio de expresión silvestre. (F) Clones *UASDras^{V12}* (*act-Gal4*, 24-48 h DDH). Clones en la periferia del ala (flechas) expresan abundantemente *ara/caup* y, en menor medida, *tup*. (G-H) Sobreexpresión controlada por temperatura de *mkp3* en el dominio de *ptc* (ver sección M7). La sobreexpresión de *mkp3* elimina la expresión de *ara/caup* (flechas en G-H), pero no la de *tup*, tanto en el tercer estadio larvario (G) como en el segundo (H). Los paneles de la derecha muestran el patrón endógeno de *ara/caup* en discos de edad similar a los experimentales.

y la especificación del notum se produce precisamente en el segundo estadio larvario. Para comprobar si la expresión de *tup* es o no dependiente del EGFR durante la especificación del notum, analicé el efecto de inhibición de la vía del EGFR en discos de segundo estadio. La sobreexpresión de *mkp3*, una fosfatasa específica de la MAPK fosforilada (Ruiz-Gómez y cols., 2005; ver sección M7), reduce fuertemente la expresión de *ara/caup*, pero no la de *tup*, en discos de segundo y de tercer estadio temprano (Fig. R25.G-H). Esto permite extender al segundo estadio larvario la no regulación de la expresión de *tup* por el EGFR.

R7-2 La señalización por Dpp activa la expresión de *tup*

El patrón de expresión de *tup* en el tercer estadio larvario sugiere una dependencia de la señalización por el morfógeno Dpp. Comprobamos que esta dependencia era real al examinar los efectos de manipular la actividad de la vía de Dpp sobre la expresión de *tup*. Clones mutantes para *thick veins* (*tkv*) que codifica el receptor de tipo I de Dpp (Brummel y cols., 1994; Nellen y cols., 1994; Penton y cols., 1994) inducidos hasta 96 h

DDH, pierden la expresión de *tup* en casi todo su dominio, salvo la región más distal (Fig. R26.A-B). En cambio, al sobreestimar la vía mediante la sobreexpresión de *UAS-tkv^{QD}* se activa la expresión de *tup*, si bien esta capacidad se restringe a la región proximal del notum (Fig. R26.C). Esto sugiere la existencia de otros reguladores positivos de *tup*, además de la señalización por Dpp. Hay que destacar que la regulación positiva de *tup* por Dpp también ocurre durante el tercer estadio larvario temprano y durante el segundo, puesto que la sobreexpresión del inhibidor *UAS-Dad* (el anti-smad de *Drosophila*; Inoue y cols., 1998; Tsuneizumi y cols., 1997) también elimina la expresión de *tup* en discos de estos periodos (Fig. R26.D-E). Aunque se sabe que durante el segundo estadio larvario la expresión de *dpp* y la actividad de su vía en el territorio proximal del disco es débil (Burke y Basler, 1996; Cavodeassi y cols., 2002; Masucci y cols., 1990), parece ser suficiente para la activación de *tup*.

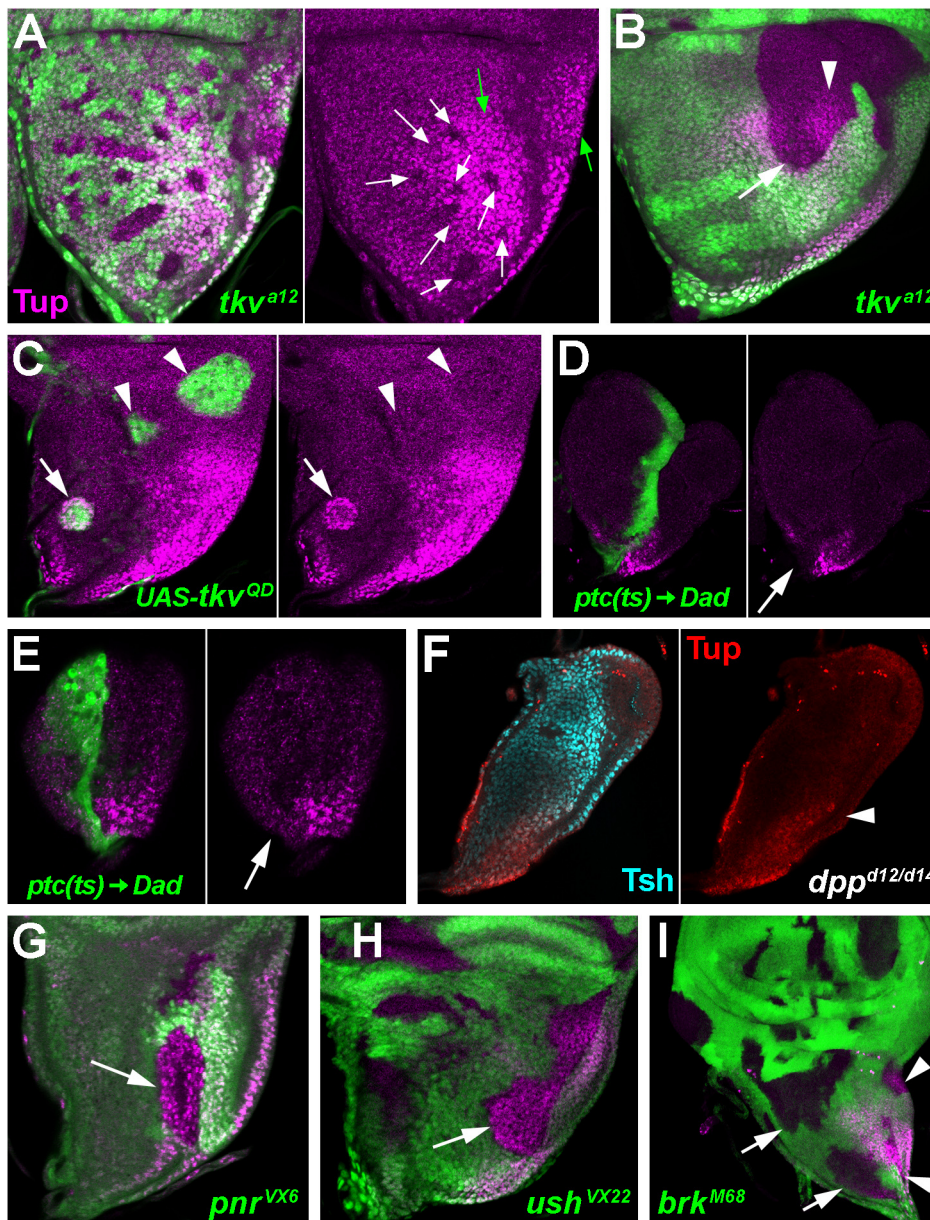
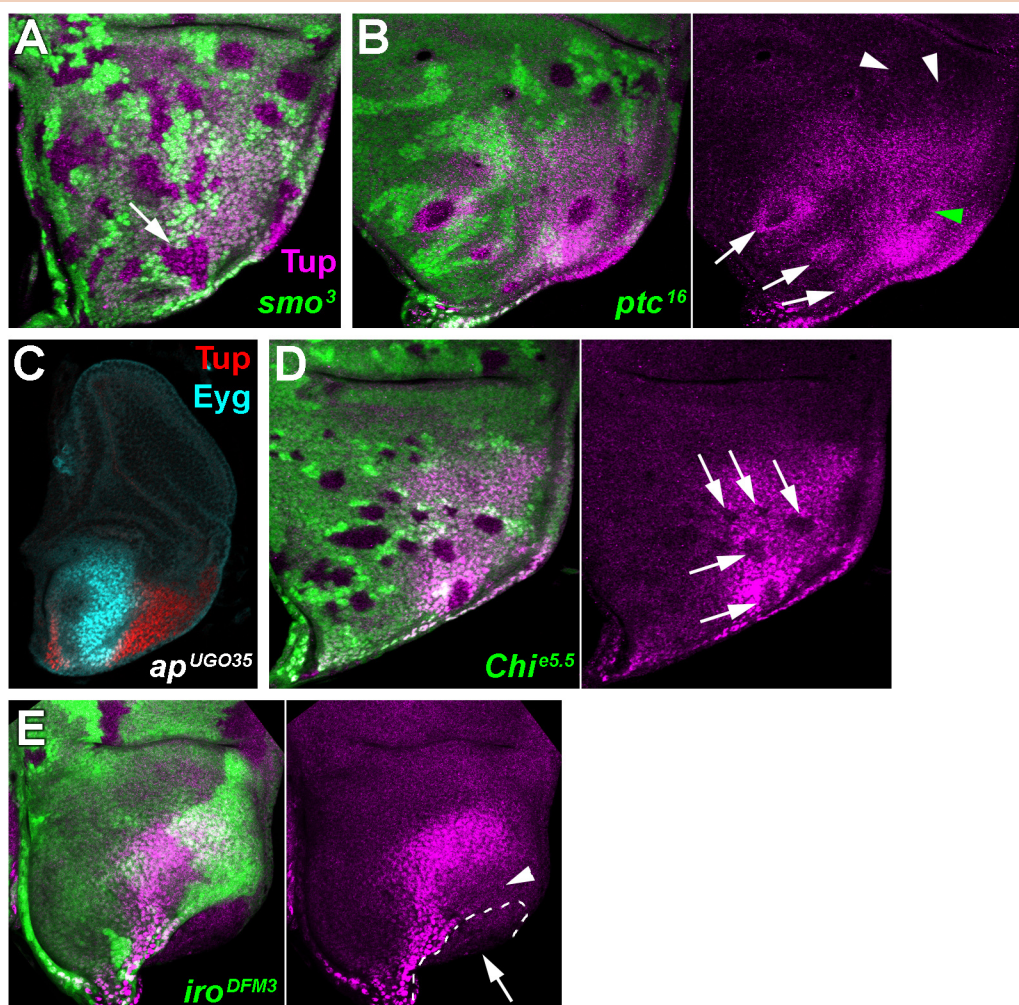


Figura R26. La expresión de *tup* requiere la señalización por Dpp. (A) Clones nulos para *tkv* (72-96 h DDH) en los que se pierde la expresión de *tup* (flechas blancas). En algunos clones distales la expresión permanece (flechas verdes). (B) Clon *tkv* (24-48 h DDH) en cuya parte proximal se pierde la expresión de *tup* (flecha) pero ésta permanece en la distal (punta de flecha, morado). (C) Clones *UAS-tkv^{QD}* (*act-Gal4*, 48-72 h DDH). *tup* se activa en el clon proximal (flecha), pero no en los distales (puntas de flecha). (D-E) Sobreexpresión controlada por temperatura de *UAS-Dad* en el dominio de *ptc* (ver sección M7). La sobreexpresión de *UAS-Dad* elimina la expresión de *tup* (flechas en D y E) tanto en el tercer estadio larvario (D) como en el segundo (E). (F) Expresión de *tup* (rojo) en un disco *dpp^{d12/d14}*, en el que la expresión de *dpp* está reducida en los discos imaginales. La expresión de *tup* parece reducida pero es detectable (punta de flecha). La expresión de *tsh* (azul) marca todo el disco excepto el territorio de ala, que está muy reducido. (G-I) Clones *pnr* (48-72 h DDH), *ush* (24-48 h DDH) y *brk* (24-48 h DDH), respectivamente, en los que la expresión de *tup* permanece (puntas de flecha).

Esto también se sustenta por el hecho de que la reducción de la expresión de *dpp* en la combinación alélica *dpp^{d12/d14}* afecta fuertemente al crecimiento del disco y en especial del territorio de ala (Bryant, 1988; Cavodeassi y cols., 2002), pero no impide la expresión de *tup* (Fig. R26.F).

Puesto que *pnr* y *ush* son otros dos genes diana de la vía de Dpp en la región proximal del notum (Sato y Saigo, 2000; Tomoyasu y cols., 2000), estudié su efecto sobre la expresión de *tup*. La ausencia de cualquiera de los dos no parece alterar la expresión de *tup* (Fig. R26.G-H). También comprobé si *brk*, que habitualmente reprime los genes regulados positivamente por *dpp* (Campbell y Tomlinson, 1999; Jazwinska y cols., 1999; Minami y cols., 1999), podía participar en la regulación de *tup*, pero su falta de función tampoco altera la expresión de *tup* (Fig. R26.I).

Figura R27. Exploración de otros posibles reguladores de la expresión de *tup*. (A) Clones *smo* (48-72 h DDH) en los que la expresión de *tup* (morado) permanece. (B) Clones *ptc* (48-72 h DDH). Los clones localizados proximalmente expresan ectópicamente *tup* (flechas), pero los más distales no (puntas de flecha blancas). La falta de *tup* en el centro de los clones (flechas, punta de flecha verde) es sólo aparente, pues *tup* se detecta en los clones en planos focales basales (no mostrado). (C) Disco mutante *ap*. El territorio de ala está muy reducido, pero la expresión notal de *tup* (rojo) y de *eyg* (azul) es normal. (D) Clones *Chi^{pe5.5}* inducidos tardíamente (72-96 h DDH), y que por tanto no se transforman a axila, pierden o reducen la expresión de *tup* (flechas). (E) Clon nulo para el C-Iro (24-48 h DDH), que pierde la expresión de *tup* (flecha) e induce su represión en el territorio adyacente (punta de flecha).



R7-3 Exploración de otros posibles reguladores

Ante los indicios que sugerían la existencia de activadores de *tup* adicionales a la vía de Dpp, analicé otros candidatos posibles. La vía de *hh* no parece ser importante, puesto que los clones mutantes para el receptor *smoothened* (*smo*) (Alcedo y cols., 1996; van den Heuvel y Ingham, 1996) no alteran la expresión de *tup* (Fig. R27.A). Los clones mutantes para *patched* (*ptc*), que reprime la señalización por *hh* (Chen y Struhl, 1996; Chen y Struhl, 1998), expresan *tup* ectópicamente, e inducen su expresión en las células adyacentes (Fig. R27.B); este efecto probablemente se debe a la expresión ectópica de *dpp* en los clones *ptc* (Capdevila y cols., 1994), que activa subsidiariamente la expresión de *tup*. De hecho, los clones *ptc* tienen las mismas limitaciones espaciales para expresar ectópicamente *tup* que los clones de activación de la vía de Dpp (Fig. R27.B). La vía de señalización de *wg* tampoco parece regular a *tup*, puesto que ni el exceso ni la ausencia de actividad (por sobreexpresión de *UAS-arm^{S10}* o *UAS-dTCF^{AN}*, respectivamente) parecen afectar a su expresión, aunque sí a la de su gen diana *zfh-2* (datos no mostrados). Rutas de señalización implicadas en el cierre torácico, como la de JNK o la del PVR (Agnès y cols., 1999; Ishimaru y cols., 2004), tampoco tuvieron efecto en la expresión de *tup* en las pruebas realizadas (sobreexpresión de *UAS-puc* y de *UAS-λPVR*, respectivamente; datos no mostrados).

El selector dorsal *ap* no se requiere para la expresión de *tup* (Fig. R27.C), como sugieren los fenotipos de falta de función de *ap* (Stevens y Bryant, 1985; Wilson, 1981). *Chip*, en cambio, sí parece ser necesario, ya que la expresión de *tup* se reduce en los clones nulos para *Chip* inducidos en tercer estadio larvario (Fig. R27.D). *Chip* actúa en el notum como cofactor de *Ap*, *Pnr* y, según los resultados expuestos en esta tesis, probablemente también de *Tup*, pero ni *ap* ni *pnr* son necesarios para la expresión de *tup*. Esto abre la puerta a una posible autorregulación de *tup* en el territorio de notum. Alternativamente, otro factor de identidad desconocida podría requerir el concurso de *Chip* para activar la expresión de *tup*. Finalmente, analicé la expresión de *tup* en clones nulos para el C-Iro (*iro^{DFM3}*); estos clones se transforman a territorio de axila (Diez del Corral y cols., 1999) y pierden la expresión de *tup* (Fig. R27.E), tal como era previsible.

discusión

'[...] it appears to me the doing what little we can to increase the general stock of knowledge is as respectable an object of life as one can in any likelihood pursue.'

Charles R. Darwin (1833) *Carta desde Maldonado*

Biryukova y Heitzler (2005) han caracterizado la función de *tailup* en el establecimiento del patrón de órganos sensoriales del mesotórax de *Drosophila*, proceso que ocurre durante el tercer estadio larvario. El trabajo de esta tesis ha consistido, por un lado, en analizar la función de *tup* en los estadios larvarios anteriores, durante los que tiene lugar la especificación del territorio presuntivo de notum, y por otro, en reevaluar el efecto de *tup* en el patrón de órganos sensoriales.

D1 Función de *tup* en la especificación del notum

He realizado un análisis clonal del alelo nulo *tup^{ex4}*, obtenido específicamente para este fin, y de los alelos preexistentes *tup¹*, *tup²* y *tup^{isl-1}*. Todos ellos producen defectos similares en el tejido de notum adulto. La falta de función de *tup* da lugar a diversos fenotipos, que en conjunto indican una reorientación de su programa de desarrollo hacia la formación de la articulación alar en vez de epidermis de notum. Esta alteración de destino se aprecia inequívocamente en los clones que producen en el notum estructuras propias de la axila, como tégulas, rudimentos de tégulas o escleritos (Fig. R4.D-E,G). En otros clones, estas transformaciones hacia axila se manifiestan en diversas malformaciones de la cutícula del notum en las que pueden aparecer sensilas típicas de la articulación del ala (Fig. R4.H-I, Fig. R5.E,G). La mayoría de los clones inducidos en tercer estadio producen invaginaciones de cutícula notal, que a menudo contienen quetas y que pueden desprenderse del tejido y formar vesículas esféricas (Fig. R5.A-D). Fenotipos análogos se pueden observar en el metatórax (Fig. R6.B-C). En el mesotórax, algunos clones causan una pérdida de tejido que puede llevar a la falta de un heminotum completo (Fig. R4.A-C).

En consonancia con esta interpretación, cuando los clones *tup* se analizan en el territorio de notum del disco imaginal, se observa que las células mutantes expresan genes que normalmente se activan en el territorio de la axila, (sea de manera exclusiva o más abundantemente). Tal es el caso de *zfh2*, *msh*, *sal*, *tsh* y el gen *lacZ* en la inserción *l(2)09261* (Fig. R8). En ocasiones esta desrepresión ocurre de manera no autónoma (Fig. R8.C), lo cual concuerda con la observación de que en el adulto,

a veces las estructuras de axila asociadas a los clones *tup* incorporan también tejido silvestre (Fig. R4.E). Estos datos refuerzan la interpretación de que los clones *tup* se transforman en axila, pues los bordes notum/axila producidos artificialmente pueden producir efectos no autónomos (Diez del Corral y cols., 1999; Villa-Cuesta y Modolell, 2005). Consecuentemente, las expresiones típicas de notum de *eyg*, *ush*, *pnr* y *wg* por lo general se pierden en los clones *tup*. Sin embargo, los clones *tup* pueden expresar simultáneamente genes típicos de notum y de axila (Fig. R11). Esta conjunción de marcadores no se produce en condiciones silvestres y podrían dar cuenta de las malformaciones que en el adulto mantienen apariencia de tejido de notum pero albergan sensilas propias de la axila (Fig. R4.H-I y Fig. R5.E-G). Combinaciones de expresiones de genes que sugerirían transformaciones en pleura mesotorácica (*opa⁺ ara/caup⁺ ap⁺*), en ala (*nub⁺*) o en membrana peripodial (*opa⁺ Ubx⁺*) no se han observado (Fig. R9), si bien la expresión de *opa*, que sí ocurre en algunos clones *tup*, resulta difícil de interpretar en el contexto de una transformación a axila.

Los defectos morfológicos asociados a los clones *tup* dependen del momento en que éstos se inducen (Tabla R2, Fig. R5.I). Las transformaciones más claras sólo se dan en los clones inducidos tempranamente; conforme se retrasa el momento de inducción, las transformaciones se vuelven más sutiles y finalmente sólo se observan alteraciones en la cutícula de notum. El efecto de los clones *tup* en la expresión de marcadores de los territorios de articulación y notum se correlaciona bastante bien con esta serie temporal: los clones inducidos en primer estadio son los que más consistentemente expresan genes de axila y desactivan genes de notum, y cuando los clones se forman a partir del segundo estadio estos efectos son progresivamente menos penetrantes. También hay que destacar que clones inducidos en cualquier momento del periodo larvario pueden desarrollarse normalmente (Tabla R2). Todo esto sugiere que *tup* se necesita al principio del desarrollo larvario para iniciar la especificación del notum, y después su requerimiento decae paulatinamente y son otros factores los que mantienen la identidad del tejido. Otra alternativa sería que el programa de desarrollo iniciado por *tup* sea reactivo a revertirse, y sólo los clones inducidos tempranamente disponen de tiempo suficiente para reespecificarse. La falta de interacciones genéticas entre *tup* y mutaciones para diversos factores epigenéticos (tanto del grupo *trithorax* -*trxG*- como *Polycomb* -*PcG*-, ver Tabla S1) arguye en contra de esta última posibilidad.

Las malformaciones de cutícula pueden aparecer en cualquier región del notum, pero cada fenotipo presenta una distribución particular (Fig. R5.H). En concreto, la formación de estructuras obviamente axilares (tégulas, escleritos) sólo ocurre en la región del notum adyacente a la articulación, y las transformaciones incompletas también tienden a aparecer en el notum distal (lateral). Esto contrasta con la activación de marcadores de axila y la represión de marcadores de notum en los discos imaginales,

que se observa más consistentemente en los clones tempranos que crecen en la parte proximal (medial) del notum presuntivo (Figs. R8.B,J-K y R10.F y R11.E). En el adulto no se recuperan clones *tup* con la localización y el tamaño correspondientes a éstos, así que es de suponer que las larvas con tales clones dan lugar a moscas a las que falta parte o todo un heminotum o en las que un disco no ha evertido correctamente. Los clones distales pueden producir estructuras de axila en el adulto, pero analizados en el disco, los clones localizados en la región correspondiente no parecen expresar marcadores de axila. Posiblemente estos clones se benefician en su desarrollo de la proximidad de la axila endógena, y podría suceder que expresaran genes importantes para el desarrollo de la axila todavía desconocidos. A este respecto es importante destacar que *msh*, que es el marcador que más frecuentemente se desregula, no garantiza por sí mismo la formación de estructuras de axila (Villa-Cuesta y Modolell, 2005), y de hecho es un gen que ni siquiera se expresa en la tégula prospectiva (territorio que, en cambio, sí expresa *ara/caup*; Gómez-Skarmeta y cols., 1996).

La distribución temporal y espacial de los distintos efectos asociados a los clones *tup* (Tabla R2) observa una buena correlación con la evolución del patrón de expresión de *tup* a lo largo del desarrollo larvario. Si bien *tup* se expresa desde muy temprano en toda la parte proximal del disco, en una región que probablemente comprende la mayoría del notum salvo su parte más distal, esta expresión se restringe al principio del tercer estadio larvario a un triángulo en la región posterior del territorio de notum (Fig. R2).

Los factores LIM-HD tienen en distintos organismos funciones comunes en la formación y diferenciación de motoneuronas e interneuronas. Fuera del sistema nervioso, cada factor puede participar también en la especificación de diferentes tipos celulares y territorios en desarrollo (Hobert y Westphal, 2000; Hunter y Rhodes, 2005). En *Drosophila*, las funciones de *tailup* descritas hasta ahora se ceñían a su participación en el código LIM-HD de diferenciación de motoneuronas (Thor y cols., 1999; Thor y Thomas, 1997) y a un papel permisivo en el desarrollo de la amnioserosa (Frank y Rushlow, 1996). En cambio, los genes *islet* de vertebrados se han relacionado con el desarrollo del páncreas y el corazón (revisado en Hunter y Rhodes, 2005), y se ha descrito su expresión en etapas tempranas en los primordios de las extremidades (Shiga y cols., 2002). La recientemente descrita implicación de *tup* en el desarrollo del corazón larvario de *Drosophila* (Tao y cols., 2007), junto con este trabajo, corroboran que en *Drosophila* *tup/isl* especifica también estructuras prospectivas, igual que otros LIM-HD como *ap* y *lim1*, que intervienen en el desarrollo de ciertos territorios en el ala (Cohen y cols., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993) y la pata (Pueyo y Couso, 2004; Pueyo y cols., 2000).

D2 Tup actúa formando un complejo con Chip y Ssdp

D2-1 El complejo hexamérico 2Tup•2Chip•2Ssdp

Chip es el homólogo de LDB/NLI/CLIM, un cofactor capaz de homodimerizar y heterodimerizar con todos los miembros de la familia LIM-HD para formar un tetramero funcional (revisado en Hobert y Westphal, 2000; Matthews y Visvader, 2003). A los complejos que forma Chip/LDB con Ap y Lim-1/Lhx-1 se puede unir el cofactor Ssdp por medio de interacciones directas con Chip/LDB (Chen y cols., 2002; Nishioka y cols., 2005), constituyéndose así un hexámero. Tup es capaz de unirse físicamente a Chip (Biryukova y Heitzler, 2005; van Meyel y cols., 1999), y tanto Chip como Ssdp se expresan uniformemente en los discos imaginales (Fernández-Fúnez y cols., 1998; Morcillo y cols., 1997; van Meyel y cols., 2003). Por lo tanto, parece muy probable que el complejo 2Tup•2Chip•2Ssdp pueda formarse en el territorio de notum. A este respecto, cabía preguntarse si la función de Tup en la especificación del notum requería la formación de este complejo hexamérico. Varias observaciones indican que así es. Los clones de falta de función de *Chip* y los clones hipomorfos para *Ssdp* pierden la expresión del gen de notum *eyg*, adquieren ectópicamente la de *zfh-2*, que es exclusiva de la axila distal, o activan no autónomamente al marcador de axila dorsal *msh* (Fig. R13.A-E y Fig. R14.A). Además, en ocasiones moscas con clones que carecen de Chip o Ssdp pueden desarrollar estructuras de axila en el notum (Fig. R13.F y Fig. R14.B), fenotipos consistentes con la importancia de ensamblar un complejo 2Tup•2Chip•2Ssdp para formar el notum. El hecho de que las expresiones ectópicas de *UAS-Chip* y *UAS-Chip^{ADD}* puedan producir los mismos efectos en los marcadores de axila y notum que la falta de *Chip* (Fig. R14.D y datos no mostrados), también apoya la hipótesis de que Chip y Ssdp actúan en un complejo hexamérico con Tup (Fig. I10.B). Estos complejos con función “pronotum” no involucrarían a Ap, ya que la reducción o eliminación de *ap* no interfiere con la especificación de este territorio (Stevens y Bryant, 1985; Wilson, 1981; Williams y cols., 1993). Chip y Ssdp cumplen con seguridad funciones adicionales en el notum, ya que Ssdp se requiere para la viabilidad celular (van Meyel y cols., 2003) y mis observaciones) y Chip interacciona genéticamente con Pnr (Ramain y cols., 2000) y mis observaciones). Además, ambos se requieren para la función de Ap en el ala dorsal y la axila (Chen y cols., 2002; Fernández-Fúnez y cols., 1998; Milán y Cohen, 1999; Milán y cols., 2001; van Meyel y cols., 1999; van Meyel y cols., 2003).

Biryukova y Heitzler (2005), estudiando la función de *tup* como elemento del prepatrón de macroquetas del notum, han propuesto un modelo de interacción para Tup diferente de este complejo hexamérico. De acuerdo con su modelo, Tup

antagonizaría la función de Pnr y Chip uniéndose a ellos y bloqueando así interacciones necesarias para la función de éstos (Biryukova y Heitzler, 2005). En concreto, Tup interferiría con la comunicación entre el regulador-cis DC y los promotores de *ac/sc*, impidiendo las interacciones entre Chip y Ac/Sc•Da y entre Pnr y el ADN del regulador DC. Pero este efecto antagonista de Tup sobre la actividad de Chip y Pnr no parece tener lugar durante la especificación del notum. En primer lugar, la falta de Chip y la de Tup tienen efectos similares, no antagónicos. Y en segundo lugar, el homeodominio de Tup parece prescindible para bloquear la formación del complejo Pnr•Chip•Ac/Sc, pero en cambio se necesita para la función “pronotum” (Fig. R12. B-C), lo que sugiere que la función de Tup incluye unirse al ADN.

Curiosamente, la sustitución en el mutante *Chip^E* de una arginina conservada del LID (posición 504) por un triptófano (R504W), parece suficiente para eliminar la interacción por la que Tup inhibe la función de Chip como activador del C-AS (Romain y cols., 2000). La mutación del mismo residuo en Ldb1 por una alanina (R324A) reduce al menos un orden de magnitud la interacción entre el LID y el dominio LIM de LMO4 (Deane y cols., 2004), lo que indicaría que se trata de un aminoácido importante para la interacción general entre LID y LIM; sin embargo, *Chip^E* parece haber perdido específicamente la capacidad de unirse a Tup, pero no a Ap (Biryukova y Heitzler, 2005; Romain y cols., 2000). A pesar de esto, los individuos *Chip^E* no tienen problemas de especificación de notum (Romain y cols., 2000), y la sobreexpresión de *UAS-tup* aún es capaz de suprimir el fenotipo de cerdas supernumerarias de los animales *Chip^E*, lo que en conjunto sugiere que *Chip^E* aún mantiene cierta capacidad de unión con Tup. Podría ser que bastara poca cantidad del complejo 2Tup•2Chip•2Ssdp para ejecutar la función pronotum, como indica el hecho de que los individuos homocigóticos para el alelo *tup^{d03613}*, siendo éste un hipomorfo fuerte y semiletal (Tabla R1), presentan un notum perfectamente formado cuando llegan a adulto (Fig. R21.A).

D2-2 Otras posibles interacciones de Tup que no se han detectado

Además de las ya mencionadas, se han descrito otras proteínas que pueden interactuar físicamente con los factores Isl. La mayoría de éstas no parecen tener función en la especificación del notum. Así, las homeoproteínas Otx pueden interactuar con Ldb y formar heterotetrámeros con factores LIM-HD (Bach y cols., 1997). Pero en *Drosophila*, *ortodenticle* (*otd*) sólo se requiere en la cutícula adulta de la genitalia y la cabeza (Wieschaus y cols., 1992). Asimismo, Isl parece poder unirse físicamente al receptor de estrógenos (Gay y cols., 2000) y al receptor nuclear huérfano *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4; (Eeckhoutte y cols., 2006). En *Drosophila* no existe homólogo del ER, pero sí del HNF4 (revisado en King-Jones y Thummel, 2005). Para comprobar si el HNF4 de *Drosophila* tiene actividad en el territorio de notum, utilicé un transgén que codifica una proteína quimérica entre el dominio de unión a ADN de

Gal4 y el dominio de transactivación y unión a ligando de dHNF4. Esta proteína se activa en presencia de los ligandos de HNF4 y sólo así puede promover la transcripción de una línea UAS (Palanker y cols., 2006). Usando la línea UAS adecuada, he podido comprobar que esta proteína no está activa durante el periodo larvario en el disco de ala (datos no mostrados). Algunos factores LIM-HD pueden interaccionar directamente con proteínas POU-HD (Bach y cols., 1995; Xue y cols., 1993). De los miembros de esta familia en *Drosophila*, sólo *ventral veins lacking/drifter* (*vvl/dfr*) parece expresarse en el notum (de Celis y cols., 1995) y además parece existir una interacción genética entre *vvl/dfr* y *tup/isl* en la especificación de motoneuronas del sistema nervioso embrionario (Certel y Thor, 2004). Sin embargo, la falta de función de *vvl* en el notum (usando el alelo letal *vvl^{ZM}*) no parece tener más que un efecto leve en el patrón de macroquetas (datos no mostrados).

Algunas de las interacciones que se han descrito para otros LIM-HD no han podido explorarse por falta de herramientas. La carencia más importante es la de la ubiquitín-ligasa RLIM/Rnf12, que en vertebrados puede vincular los factores LIM-HD a proteínas con actividad histona-deacetilasa y formar un complejo represor de la transcripción (Bach y cols., 1999) o regular la ubiquitinación de LDB, afectando a su estabilidad y a su afinidad por diferentes dominios LIM (Hiratani y cols., 2003; Ostendorff y cols., 2002). El ortólogo en *Drosophila* de RLIM se ha identificado con el producto del gen *goliath* (Bach y cols., 1999), pero no existen mutaciones disponibles. En el primer análisis del interactoma de *Drosophila* se encontraron once factores que podían unirse físicamente a Tup (Giot y cols., 2003), de los que siete eran citoplasmáticos y un octavo, nucleolar, así que no se consideró el probarlos. El noveno era Chip. Los dos restantes eran Lim3 y Bap60. El homólogo de Lim3 en vertebrados, Lhx3, puede unirse a los LIM de Isl-1 a través de su homeodominio (Thaler y cols., 2002), pero las hibridaciones in situ realizadas no mostraban expresión de *lim3* en el disco imaginal de ala/notum (datos no mostrados), por lo que no se han realizado más pruebas. Para *bap60* (*Brahma associated protein 60*) no existen mutantes, pero *tup* no parece interaccionar genéticamente con otros miembros del complejo Brahma (concretamente *osa* y *brm*, ver Tabla S1).

D3 *tup* y el C-Iro cooperan en la especificación del notum

Los genes del C-Iro tienen, al igual que *tup*, una función en la especificación del territorio de notum. Pero, al contrario de lo que ocurre con *tup*, la función pronotum del C-Iro se requiere de manera absoluta durante el primer y el segundo estadio larvario, en toda la extensión del territorio de notum (Diez del Corral y cols., 1999). Si bien no todos los clones mutantes para el C-Iro producen estructuras articulares en el adulto, la expresión ectópica de marcadores de axila ocurre con penetrancia completa.

En cambio, las transformaciones son bastante menos frecuentes en los clones *tup*, pueden no ocurrir incluso en clones inducidos al principio del desarrollo larvario, y en numerosas ocasiones se producen transformaciones incompletas. Este contraste sugiere que los genes del C-Iro son los responsables principales de asignar las células al destino de notum, mientras que *tup* reforzaría o confirmaría esa identidad. La función de *tup* parece especialmente importante en la región proximal del disco. Allí la expresión de *ara/caup* se elimina en el tránsito al tercer estadio larvario, pero la de *tup* se mantiene, y esa es la zona donde el requerimiento de *tup* es mayor (evaluado en el disco imaginal, por la desrepresión de marcadores de axila).

Resulta llamativo que los genes del C-Iro, con ser imprescindibles para la especificación del notum, cuando se sobreexpresan son generalmente incapaces de imponer la identidad de notum en otros territorios. Sólo mediante la expresión muy temprana uno de los miembros del C-Iro (*UAS-ara*) en el territorio de ala se ha producido tejido ectópico de notum, y siempre en forma de duplicaciones simétricas con respecto al notum normal (Aldaz y cols., 2003; Diez del Corral, 1998; Wang y cols., 2000). Dado que la activación de *UAS-ara* en el ala interfiere con la expresión de *wg* (Diez del Corral, 1998), la mejor interpretación de estos fenotipos de sobreexpresión es que fenocopian la carencia temprana de *Wg* en el territorio de ala, que entonces se especifica como un segundo notum (Couso y cols., 1993; Morata y Lawrence, 1977; Ng y cols., 1996; Sharma y Chopra, 1976). Las sobreexpresiones de *UAS-tup* tienen limitaciones similares: sólo producen tejido de notum adicional en forma de duplicaciones a costa del ala, cuando se emplean algunas líneas *Gal4*, siempre tempranas (Fig. R16.A-C). Otras sobreexpresiones de *UAS-tup*, algunas también tempranas (por ejemplo *vg-Gal4*, Fig. R16.D), reducen en diverso grado el tamaño del ala o matan al individuo; pero no existe una serie fenotípica en la transformación. Además, la expresión ectópica de *UAS-tup* también puede interferir con la expresión de *wg* en el ala (Figs. R17.F y R18.G''). Por tanto, se puede concluir que las duplicaciones de notum por sobreexpresión de *UAS-tup* se deben a una interferencia con la especificación temprana del territorio de ala que, por defecto, se especifica como notum.

La línea C765, de expresión suave y tardía, no induce transformaciones en notum cuando dirige la expresión de *UAS-ara* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996). Cuando dirige la de *UAS-tup* el resultado es similar, a excepción de un pequeño efecto en la pleura (Fig. R18.C). En cambio, cuando dirige la expresión de ambos transgenes simultáneamente, el tejido de notum se extiende ampliamente y desaparece el ala. En este caso, el fenotipo no puede atribuirse a la falta temprana de *wg*. Por un lado, la transformación no consiste en una duplicación, sino en una expansión del notum (Fig. R18.D). Por otro lado, con la coexpresión de *UAS-tup* y *UAS-ara* se produce una gran expansión de los dominios de expresión de *eyg* y la línea *DC-lacZ*, y además esto sucede entrado el tercer estadio, en discos que tienen el territorio de pleura, axila y ala claramente formados (Fig. R18.H-H'). Esto implica que estas regiones han sido

especificadas previamente según el plan de desarrollo normal, y que la expresión de marcadores de notum les ha sido impuesta después. Además, la línea C765 no es capaz de producir duplicaciones de notum cuando dirige la expresión de *UAS-Axin* o *UAS-dTCF^{AN}*, ambos inhibidores de la señalización de Wg (datos no mostrados y Fig. S6.A). El hecho de que la coexpresión de *UAS-ara* y *UAS-tup* promuevan la expresión *eyg* y la aparición de tejido notal en la región esternopleural, también apoya la interpretación de que estas transformaciones no se deben al bloqueo de la señalización de Wg. Es más, probablemente las células especificadas como ala no contribuyen apenas a la estructura de notum expandido en el adulto, pues en los discos se observa que muchas células del territorio de ala sufren apoptosis (Fig. S5).

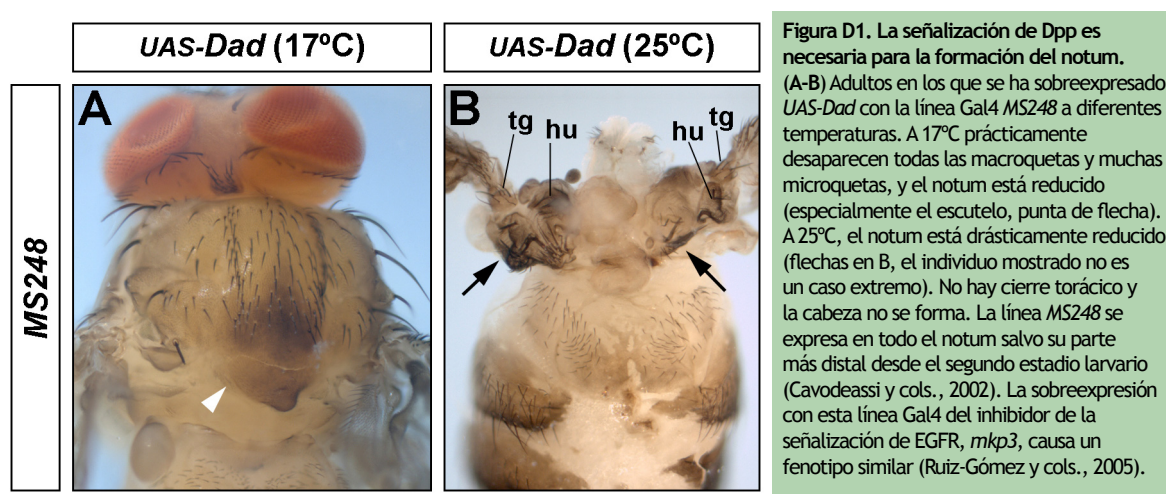
Es llamativo que la expansión del dominio de *eyg* sobre las regiones de axila y de pleura, en la sobreexpresión de *UAS-ara* más *UAS-tup*, parece seguir el patrón de expresión de *tsh* (Fig. R18.H, comparar con Fig. R8.I). Quizá *tsh* confiera la competencia para formar estructuras “tergales”, y la combinación *tup+ara/caup* sólo sea capaz de seleccionar entre el notum y los pteralios tergaes. También hay que destacar que la formación de tejido ectópico de notum se detecta exclusivamente en el segmento mesotorácico (Figs. R18.D y R19.C); la coexpresión de *UAS-tup* y *UAS-ara* induce la aparición de características de terguito en los esternitos del abdomen (Fig. R19.E-F), y aparentemente extiende el territorio de cápsula cefálica a costa del campo de omatidios (Figs. R18.D y S5.D). Esto sugiere que los territorios cuya formación se induce en presencia de *ara* y *tup* depende de la identidad homeótica del tejido “diana”, y por tanto su función es la de especificar notum como modelo de pared corporal y no como órgano.

D4 Dpp y EGFR participan en la especificación del notum

El modelo con el que se explica actualmente el desarrollo del notum adjudica una función central a la ruta del EGFR, que es necesaria para el crecimiento del territorio de notum y para la expresión de los miembros del C-Iro (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990; Simcox y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002). La contribución de Dpp, en cambio, consiste en restringir la expresión de los genes del C-Iro primero distalmente, y después en la región proximal (Cavodeassi y cols., 2002). Sin embargo, su participación en la activación temprana y tardía de *tup* en la región proximal del disco le atribuyen un efecto positivo, adicional, en el desarrollo de notum. Si bien durante los primeros estadios larvarios, la expresión de Dpp y su señalización es menor en la región proximal del disco (Burke y Basler, 1996; Cavodeassi y cols., 2002; Masucci y cols., 1990), estas parecen bastar para la activación de *tup*. Es más, la inhibición de esta señalización interfiere con el desarrollo del tejido de notum (Fig. D1) de un modo similar al de la inhibición de la señalización de EGFR (Ruiz-Gómez y

cols., 2005; Wang y cols., 2000).

Por otro lado, la activación constitutiva de la señalización de Dpp no parece ser suficiente para inducir la expresión de *tup* salvo en la región proximal del notum, lo que indica que deben existir reguladores adicionales de la expresión de *tup*. Sin embargo, la ruta del EGFR parece no tener influencia alguna en la expresión de *tup*, y ninguna otra de las rutas exploradas parece participar en el control de *tup*. Así, concluiríamos que las vías del EGFR y de Dpp (junto con otro/s factor/es) participan en la especificación del notum, promoviendo el crecimiento del territorio y activando al C-Iro y a *tup*, respectivamente (Fig. D2.A).



D5 Función de *tup* en el patrón de órganos sensoriales

Biryukova y Heitzler (2005) han descrito la función inhibitoria de *tup* en la comunicación entre el regulador-cis DC y los promotores del C-AS, en la que Tup actuaría a efectos prácticos como un factor LMO. Sin embargo la existencia, o simplemente el requerimiento, de esta comunicación es discutible, ya que los reguladores-cis del C-AS se activan exactamente igual en ausencia de productos proneurales (Gómez-Skarmeta y cols., 1995), y también son activos cuando acompañan a un promotor mínimo ajeno al C-AS (García-García y cols., 1999; Gómez-Skarmeta y cols., 1995). Añadido a esto, el mecanismo de interferencia descrito no da cuenta de todos los fenotipos asociados a los clones mutantes *tup*, en concreto, la aparición no autónoma de cerdas ectópicas (Tabla R4 y Fig. R20.B-D,G) y la supresión autónoma de las quetas de ciertas posiciones (Tabla R4 y Fig. R20.F). El requerimiento de la función de *tup* para la expresión de la línea DC-*lacZ* (construcción AS1.4DC, que lleva un promotor mínimo; García-García y cols., 1999) (Fig. R22) podría explicar la pérdida de quetas DC. También podría justificar

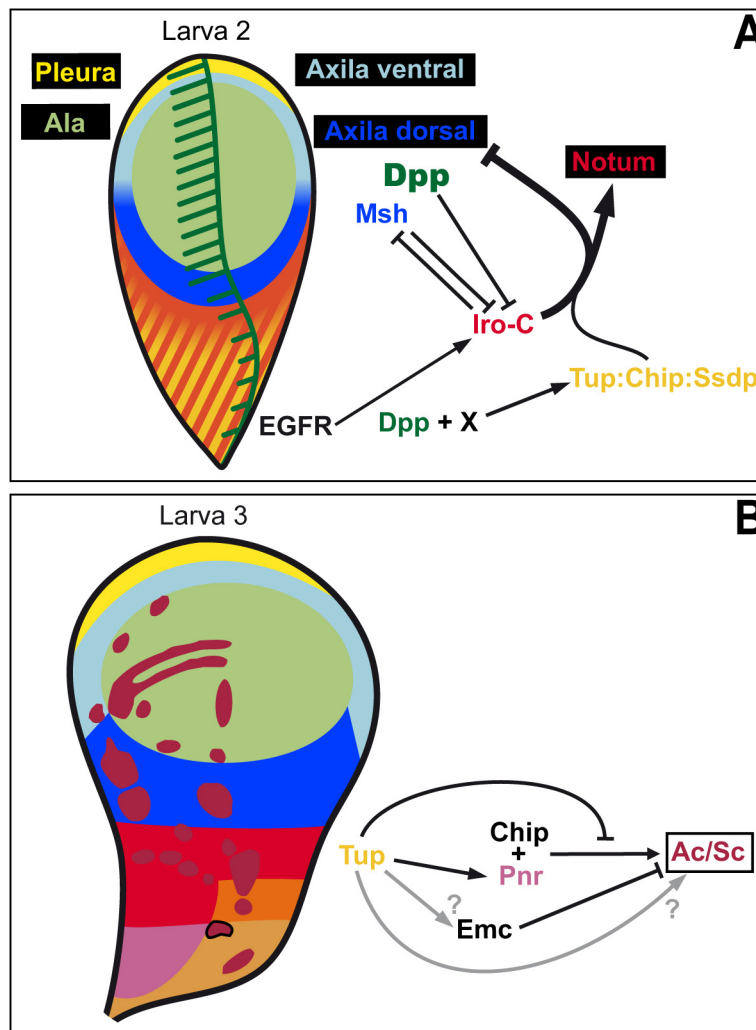


Figura D2. Resumen de la función temprana de *tup* durante la especificación de notum. (A) Durante el segundo estadio larvario, la actividad suave de la vía de Dpp en la zona proximal del disco activa la expresión de *tup*. El complejo 2Tup•2Chip•2SsdP colabora con el C-Iro en la especificación de notum y en la restricción del territorio de axila dorsal. (B) Durante el tercer estadio larvario, *tup* interviene en el establecimiento del patrón de macroquetas posiblemente de tres maneras independientes: activando la expresión de *pnr*, interfiriendo con la actividad positiva de Pnr y Chip sobre la expresión de *ac/sc* (Biryukova y Heitzler, 2005), y activando la expresión de *emc*. Podría también suceder que Tup active directamente la expresión de *ac/sc*.

la aparición no autónoma de DC adicionales en algunos casos, si se asume que el cambio en la morfología del grupo proneural, impuesto por el clon *tup*, redistribuye el potencial proneural de manera que se favorece la aparición de un OS extra (Fig. R22.D). Resultaría interesante comprobar si la falta de función de *pnr*, que puede producir OS adicionales en la región DC (Romain y cols., 1993), conlleva efectos parecidos. Quizá otros efectos no autónomos involucren la desregulación de factores difusibles, como *wg* o *gbh*.

La pérdida de actividad del regulador DC y, aún más, de la expresión de *ac/sc* en los clones *tup*, hace difícil entender la aparición autónoma de cerdas ectópicas. Las interacciones genéticas entre *emc* y *tup* (Fig. R24.B) permiten plantear la hipótesis de que *tup* fuera un regulador de *emc*, de modo que los clones mutantes *tup*, aunque tuvieran un escaso potencial proneural, podrían hacerlo efectivo debido a la escasez del antagonista Emc.

Por último, sería interesante comprobar si el requerimiento de *tup* para la activación de *AS1.4DC* se modifica o mantiene en los transgenes que incluyen el promotor endógeno de *achaete* o de *scute* (*AX2.3DC*, *5.7-0.8ac-lacZ*, *5.7-3.7sc-lacZ*;

Gómez-Skarmeta y cols., 1995; García-García y cols., 1999). La dependencia de *tup* podría deberse a que se necesita para la expresión de *pnr*, a una función directa de Tup en la activación del regulador DC (pues éste tiene secuencias consenso para los factores Isl, a las que Tup puede unirse in vitro (Biryukova y Heitzler, 2005), o a ambas cosas, lo que podría atribuir a *tup* un tercer modo de regulación sobre el patrón de OS del notum (Fig. D2.B).

conclusiones

- 1 En el disco imaginal de ala/notum de *Drosophila*, el gen *tailup* se expresa exclusivamente en el territorio de notum desde el comienzo del segundo estadio larvario. Inicialmente esta expresión cubre prácticamente todo el notum presuntivo, salvo su región más distal. Durante el tercer estadio se retira de la región anterior de este territorio.
- 2 La función de *tup* se requiere para la correcta especificación del notum. Su ausencia produce en el notum presuntivo la expresión de genes y la aparición de estructuras adultas propias de la axila alar o de un notum malformado.
- 3 La función de Tup durante la especificación del notum probablemente requiere la formación de un complejo hexamérico con Chip y Ssdp.
- 4 Para imponer la identidad de notum en otros tejidos, la coexpresión de *tup* y de *ara*, un miembro del C-Iro, es mucho más efectiva que la sobreexpresión aislada de cualquiera de los dos. Por tanto, parece que *tup* y el C-Iro actúan sinérgicamente en la especificación del territorio de notum.
- 5 En el territorio de notum, la expresión de *tup* está regulada positivamente por la señalización de Dpp y por otro/s factor/es sin identificar. Puesto que la expresión de los genes del C-Iro depende de la señalización del EGFR, estas vías de señalización convergen a través de *tup* y del C-Iro en la especificación del territorio de notum.
- 6 La expresión de *tup* en el territorio de notum es independiente de la señalización del EGFR. Tampoco parece depender de la de Wg, Hh o el PVR, ni de la actividad de Pnr, Ush, Brk ni Ap.
- 7 La falta de *tup* produce tanto un exceso como un defecto en el número de órganos sensoriales. *tup* se necesita para la actividad del regulador-cis DC del C-AS, e interacciona genéticamente con *emc*. Tup podría actuar en varios pasos del establecimiento del patrón de macroquetas.
- 8 En el proceso de especificación del notum, Tup actúa por un mecanismo molecular distinto y positivo, del propuesto, negativo, para la formación de los órganos sensoriales del notum.

anexo i

El ANEXO I se compone de las siguientes partes:

- MATERIALES Y MÉTODOS.
- Figuras suplementarias.
- Listado del contenido del CD que acompaña la tesis.

materiales y métodos

'Iván Zarevich [...] tomó la pelota, la tiró y se fue siguiéndola. [...] No se sabe cuánto tiempo anduvo ni por qué tierras, pero rompió tres pares de botas de hierro en su largo camino y se comió tres panes de hierro.'

Aleksandr N. Afanasiev (1855-63). *La rana zarevna*

M1 Estirpes de *Drosophila*

Casi todas las estirpes de *Drosophila* se pueden encontrar descritas en Flybase (Crosby y cols., 2007). Los alelos *tup^{isl-1}* (Wright y cols., 1976), *tup¹* y *tup²* (Nüsslein-Volhard y cols., 1984) se obtuvieron en sendas mutagénesis por etilmetilsulfonato. La menor deficiencia clásica que descubre el locus *tup* es la *Df(2L)OD15* (Stathakis y cols., 1995), que utilicé en análisis de complementación. Otras estirpes mutantes para *tup* se describen más adelante (sección M3-5). Como cepas de referencia se utilizaron *Oregon R* ó *y, w*.

Otras mutaciones utilizadas han sido: *ap^{UGO35}* (Cohen y cols., 1992), *brk^{M68}* (Jazwinska y cols., 1999), *brm²* (Elfring y cols., 1998), *Chi^{25.5}* (Morcillo y cols., 1997), *dpp^{d12}* y *dpp^{d14}* (St. Johnston y cols., 1990), *egfr^{1K35}* (= *egfr^{d2}*; Clifford y Schüpbach, 1994), *emc¹* y *emc^{P5C}* (Botas y cols., 1982; Garrell y Modolell, 1990), *gbb¹* y *gbb⁴* (Wharton y cols., 1999), *Tp(3,3)iro¹*, *In(3)iro^{DFM2}* e *Df(3)iro^{DFM3}* (= *iro¹*, *iro^{DFM2}* e *iro^{DFM3}*, respectivamente; Dambly-Chaudière y Leyns, 1992; Gómez-Skarmeta y cols., 1996), *lawc^{P1}* (Petruk y cols., 1998; Zorin y cols., 1999), *osa³⁰⁸* (= *eld³⁰⁸*; Treisman y cols., 1997), *Pc³* (Soto y cols., 1995; Zink y cols., 1991), *Pc^{XT109}* (= *Pc¹⁵*; Simon y cols., 1992; Strutt y Paro, 1997), *pnr^{VX6}* (Romain y cols., 1993), *pnt^{Δ88}* (Scholz y cols., 1993), *ptc¹⁶* (Strutt y cols., 2001), *ras85D^{ΔC40b}* (Hou y cols., 1995), *smo³* (Chen y Struhl, 1998), *Ssdp^{neo48}* y *Ssdp^{L5}* (van Meyel y cols., 2003), *tkv^{Δ12}* (= *tkv⁴*; Penton y cols., 1994), *Trl^{R85}* (Farkas y cols., 1994), *trx^{E2}* (Kennison y Tamkun, 1988), *ush^{VX22}* (Cubadda y cols., 1997), *vv^{LM}* (= *dfr^{ZM}*; de Celis y cols., 1995; Sánchez Soriano y Russell, 1998), *Psc^{vgD}*, *Asx^{XF23}*, *Pcl^{XM3}* (= *Pcl¹⁵*) (Brunk y cols., 1991; Jurgens, 1985; Lasko y Pardue, 1988; Simon y cols., 1992; FlyBase ID FBal0013622).

Se utilizaron las siguientes líneas UAS: *UAS-aos* (Howes y cols., 1998), *UAS-ara* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996), *UAS-Axin* (Cliffe y cols., 2003), *UAS-arm^{s10}* y *UAS-dTCF^{ΔN}* (= *UAS-pangolin^{ΔN}*; van de Wetering y cols., 1997), *UAS-Chip* y *UAS-Chip^{ΔLID}* (Milán y Cohen, 1999), *UAS-Chip^{ΔDD}* (van Meyel y cols., 1999), *UAS-Chip^{ΔCCD}* (van Meyel y cols., 2003), *UAS-Dad* (Tsuneizumi y cols., 1997), *UAS-pnr* (Haenlin y cols., 1997), *UAS-pntP1* y *UAS-pntP2* (Klaes y cols., 1994), *UAS-puc* (Martín-Blanco y cols., 1998), *UAS-λPVR* (Duchek y cols., 2001), *UAS-Raf^{ΔN}*

(=UAS-*phl*^{K497M}; Martín-Blanco y cols., 1999), UAS-*Dras1*^{V12} (=UAS-*Ras85D*^{G12V}; Karim y Rubin, 1998), UAS-*tan* (=UAS-*t*; True y cols., 2005) UAS-*tkv*^{QD} (=UAS-*tkv*^{Q199D}; Hoodless y cols., 1996), UAS-*tup* (Thor y Thomas, 1997), UAS-*tup*^{AHD} (O'Keefe y cols., 1998), UAS-*ush* (Cubadda y cols., 1997), UAS-*yellow* (=UAS-*y*; Calleja y cols., 1996), UAS-*vn* (Schnepp y cols., 1996). Además se utilizaron las inserciones: EP1383 (=UAS-*dLMO*; Zeng y cols., 1998) y M76 (=UAS-*mkip3*; Ruiz-Gómez y cols., 2005).

Las líneas Gal4 empleadas fueron: *ap*^{MD544}, *nub-Gal4*, *pnr*^{MD237} y *tsh*^{MD621} (Calleja y cols., 1996), *c765* (Gómez-Skarmeta y cols., 1996), *dpp*^{disk}-Gal4 (=dpp^{blk}-Gal4; Staehling-Hampton y cols., 1994), *en-Gal4* (Brand y Perrimon, 1993), MD638 (=sd-Gal4; Aldaz y cols., 2003), MS1096 (Milán y cols., 1998), MS248 (Cavodeassi y cols., 2002; Sánchez y cols., 1997), *omb-Gal4* (Lecuit y cols., 1996), *ptc*^{559.1}-Gal4 (Speicher y cols., 1994), *puc*^{E69-I} (Pastor-Pareja y cols., 2004), *Ubx-Gal4*^{LDN} (de Navas y cols., 2006) y *vg-Gal4* (Simmonds, 1995). Los clones de sobreexpresión se obtuvieron con la línea *act>y>Gal4* (=AyGal4; Ito y cols., 1997) y, en contadas ocasiones, con la línea *arm>y>Gal4:VP16* (Sanson y cols., 1996).

Las inserciones *lacZ* marcadoras de actividad transcripcional fueron: AS1.4DC (=DC-*lacZ*; García-García, 1999 #5000}, *esg*^{P3} (=esg⁰⁵⁷²⁹; Hayashi y cols., 1993), *l(2)09261* (Diez del Corral y cols., 1999), *msh*^{lacZ-Δ89} (=Dr^{lacZ-Δ89}; Isshiki y cols., 1997), *opa*^{3D246} (Cimbora y Sakonju, 1995), *puc*^{E69} (Martín-Blanco y cols., 1998) y *ush*¹³¹⁵ (Cubadda y cols., 1997).

M2 Caracterización de los alelos *tup*

Secuenciación de ADN genómico

Los alelos *tup*^{isl-1}, *tup*¹ y *tup*² fueron balanceados sobre *CyO*, *twiG-Gal4*, *2xUAS-eGFP*. La fluorescencia que confiere este balanceador permite distinguir los embriones mutantes de los heterocigóticos y aneuploides desde el estadio 8 de la embriogénesis (Halfon y cols., 2002). Se recogieron embriones durante la noche, se dejaron envejecer al menos 3 h a 25°C y se seleccionaron los embriones no fluorescentes en un microscopio estereoscópico MZ FLIII (Leica). Se extrajo el ADN genómico de unos 50 embriones *tup* y se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los exones correspondientes al mayor ARNm conocido (AF145674=GH12341) desde las regiones no transcritas o intrónicas adyacentes. (Los cebadores utilizados en éste y otros experimentos se detallan en un documento en el disco incluido en la tesis.) Cada producto de PCR se ligó en el vector comercial pGEM-T Easy (Promega) y se seleccionaron tres clones positivos para su secuenciación.

Los tres alelos exhibían mutaciones puntuales G→A. En el caso de *tup*¹, la cisteína 57 muta a tirosina, lo que impide la unión de Zn²⁺ al primer dedo de zinc de la proteína (Fig. M1.A); esto afecta probablemente a su capacidad para mantener interacciones

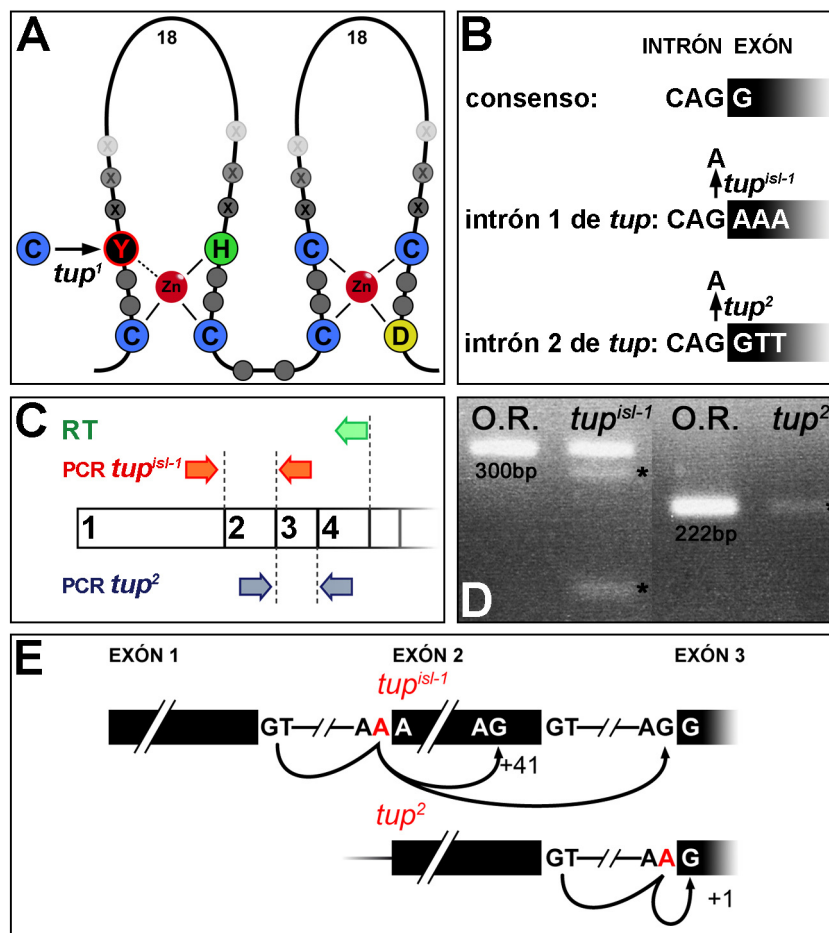


Figura M1. Efecto de las mutaciones *tup*¹, *tup*^{isl-1} y *tup*². (A) Representación de los dedos de zinc del primer dominio LIM de Tup, con el cambio que ocurre en *tup*¹ (C57Y). (B) Las mutaciones en *tup*^{isl-1} y *tup*² afectan a los sitios aceptores de ajuste de los intrones primero y segundo, respectivamente. (C) Esquema de los cebadores empleados en el análisis por RT-PCR de los transcritos de *tup*^{isl-1} y *tup*². (D) Patrón de bandas en gel de agarosa de los productos de amplificación de las RT-PCR esquematizadas en C. Los asteriscos indican bandas tenues. O.R.: Oregon R. (E) Resolución del ajuste de los transcritos de *tup*^{isl-1} y *tup*². En *tup*^{isl-1} se utiliza, además del sitio endógeno, un aceptor críptico en posición +41 respecto del sitio endógeno o el sitio aceptor del intrón siguiente. En *tup*² se utiliza el sitio endógeno u otro en posición +1 respecto de éste.

proteína-proteína. Las guanosinas afectadas en *tup*^{isl-1} y *tup*² son fundamentales en los sitios aceptores de ajuste de los intrones primero y segundo respectivamente (Fig. M1.B; ver más adelante).

Las inserciones *tup*^{d03613} y *tup*^{f04735} se habían localizado aproximadamente (Thibault y cols., 2004), suplemento 4). Con esa información diseñé cebadores para amplificar por PCR los extremos del elemento P{XP} o PBac{WH} y las regiones genómicas adyacentes (Fig. M4). La secuencia de los fragmentos reveló el sitio preciso de inserción, que coincide con lo publicado por FlyBase (FBti0042800; FBti0051955).

Caracterización de los ARNm de *tup*^{isl-1} y *tup*²

Puesto que *tup*^{isl-1} y *tup*² son mutaciones en sitios aceptores de ajuste, era necesario determinar su repercusión sobre los ARNm de *tup*. Extraje ARN total de unos 50 embriones mutantes para cada uno de los dos alelos con el método del TRIzol (Invitrogen), y lo usé como molde en una retrotranscripción (RT) con la enzima Superscript II (Invitrogen). Dupliqué las RT, usando como cebador un oligonucleótido específico para el cuarto exón (E4) en una serie, y una mezcla de hexanucleótidos (dN₆) en la otra. (Los resultados que se describen más adelante fueron equivalentes para los dos cebadores.) Los ADN de cadena simple resultantes se usaron como molde de PCR

con cebadores diseñados para amplificar desde el exón primero al tercero (para *tup^{isl-1}*) o desde el segundo al cuarto (para *tup²*; Fig. M1.C).

Los tres productos correspondientes al ARNm de *tup^{isl-1}* se podían distinguir por su tamaño en un gel de agarosa al 2% (Figs. M1.D y M2.A-B); secuencié los tres. El de menor tamaño corresponde al uso del sitio aceptor del siguiente intrón (el segundo; Fig. M1.E), lo que produce la eliminación del segundo exón y un cambio en la fase de lectura que introduce residuos incorrectos antes de llegar a un codón de terminación prematuro. La banda intermedia es consecuencia del uso de un sitio aceptor críptico en posición +41 con respecto al silvestre (Fig. M1.E), que también produce un cambio en la fase de lectura, la incorporación de varios residuos incorrectos y la aparición de un codón de terminación prematuro. La traducción de estas dos especies se interrumpiría antes de llegar al primer domino LIM. La tercera banda, la de mayor tamaño, corresponde al ajuste en la posición correcta.

En el caso de *tup²* se distinguía una sola banda en el gel, del mismo tamaño que en los controles (datos no mostrados). Secuencié cinco colonias procedentes de amplificaciones efectuadas sobre dos RT diferentes (dos RT-dN₆; tres RT-E4). De estas cinco colonias, tres correspondían al uso de la G en posición +1 del tercer exón (Fig. M1.E); nuevamente, el ARNm resultante sufre un cambio en la fase de lectura que introduce varios residuos incorrectos y finalmente un codón de terminación prematuro. Esta especie codifica hasta el primer domino LIM antes de llegar al desplazamiento de la fase de lectura. Las otras dos colonias (RT-E4) correspondían a la resolución del ajuste en la posición correcta.

Puesto que las guanosinas mutadas en *tup^{isl-1}* y *tup²* corresponden a residuos totalmente conservados en los intrones de la forma GU-AG, la obtención de productos de ajuste correcto en estos mutantes resultaba sospechosa. Así pues, quise descartar que se hubiera producido una contaminación con embriones de tipo silvestre. Hice las comprobaciones sólo con *tup^{isl-1}*, ya que la aparición de sus distintos productos se puede seguir fácilmente en un gel. En primer lugar, repetí el experimento haciendo una serie de extracciones, cada una a partir un único embrión mutante prudentemente envejecido. Usé como control negativo la levadura con

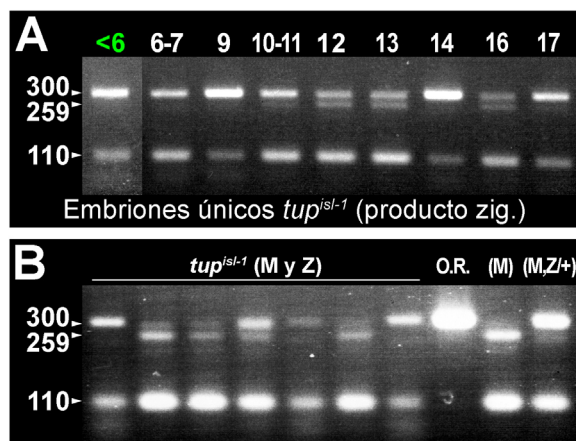


Figura M2. Comprobaciones sobre el origen del transcrito silvestre en *tup^{isl-1}*. (A) Análisis de los transcritos de *tup^{isl-1}* por RT-PCR sobre extractos de embriones mutantes únicos. Sobre cada carril está el estadio de desarrollo embrionario. En verde, carril representativo de nueve embriones del estadio 5 o anteriores, que no han envejecido lo bastante como para expresar con seguridad la *GFP* y por tanto su genotipo no es seguro. No hay correlación entre la aparición de las diferentes bandas y la edad del embrión. A la izquierda, el tamaño de las bandas en pares de bases. (B) Análisis de los transcritos de *tup^{isl-1}* por RT-PCR sobre extractos de embriones únicos, mutantes para el producto materno y cigótico (siete primeros carriles), para el materno sólo (M), para el materno y heterocigóticos para el cigótico (M,Z/+) o silvestres de la estirpe Oregon R (O.R.). La banda de tamaño silvestre no tiene origen materno.

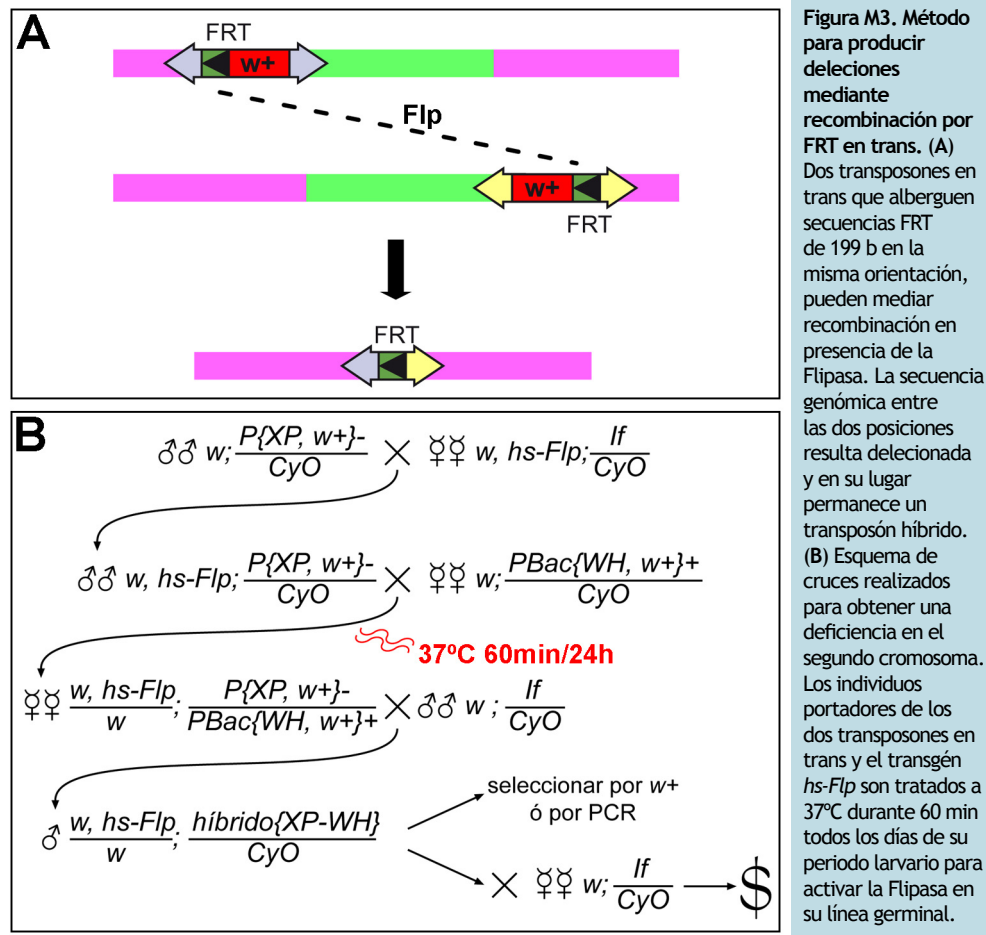
que se alimenta a sus padres. Los embriones fueron decorionados y datados en el momento de hacer la extracción, con el objeto de observar simultáneamente si existía una correlación entre la edad y la aparición de los distintos productos. Sin embargo, no se observan coincidencias entre la naturaleza de los productos y la edad de los embriones; es más, cada embrión podía tener diferentes cantidades relativas de los tres productos y, en cualquier caso, el producto silvestre se detectaba con regularidad (Fig. M2.A).

Pese a que *tup* está descrito como un gen zigótico (Nüsslein-Volhard y cols., 1984), quise descartar inapelablemente que el producto silvestre tuviera un origen materno. Mediante la técnica FLP-DFS (Chou y Perrimon, 1996; Chou y cols., 1993; Chou y Perrimon, 1992) produje clones de recombinación mitótica en la línea germinal de hembras *tup^{isl-1}/P{ovo^{D1}}* cruzadas por machos *tup^{isl-1}/CyO, twiG-Gal4, 2xUAS-eGFP*. En caso de que las madres depositaran productos del gen *tup* en el huevo, estos productos serían mutantes *tup^{isl-1}*. Recogí la progenie, la dejé envejecer 3h y seleccioné embriones fluorescentes (*tup^{isl-1}* para el producto materno) y no fluorescentes (*tup^{isl-1}* para los productos materno y zigótico). Realicé extracciones de embriones únicos de las dos clases y repetí la RT-PCR. La presencia del producto silvestre aún se detectaba en los mutantes maternos y zigóticos (Fig. M2.B). El comportamiento de estos alelos no es el esperado y, puesto que he descartado prácticamente cualquier posibilidad de contaminación, sigue siendo objeto de estudio.

M3 Obtención del alelo *tup^{ex4}*

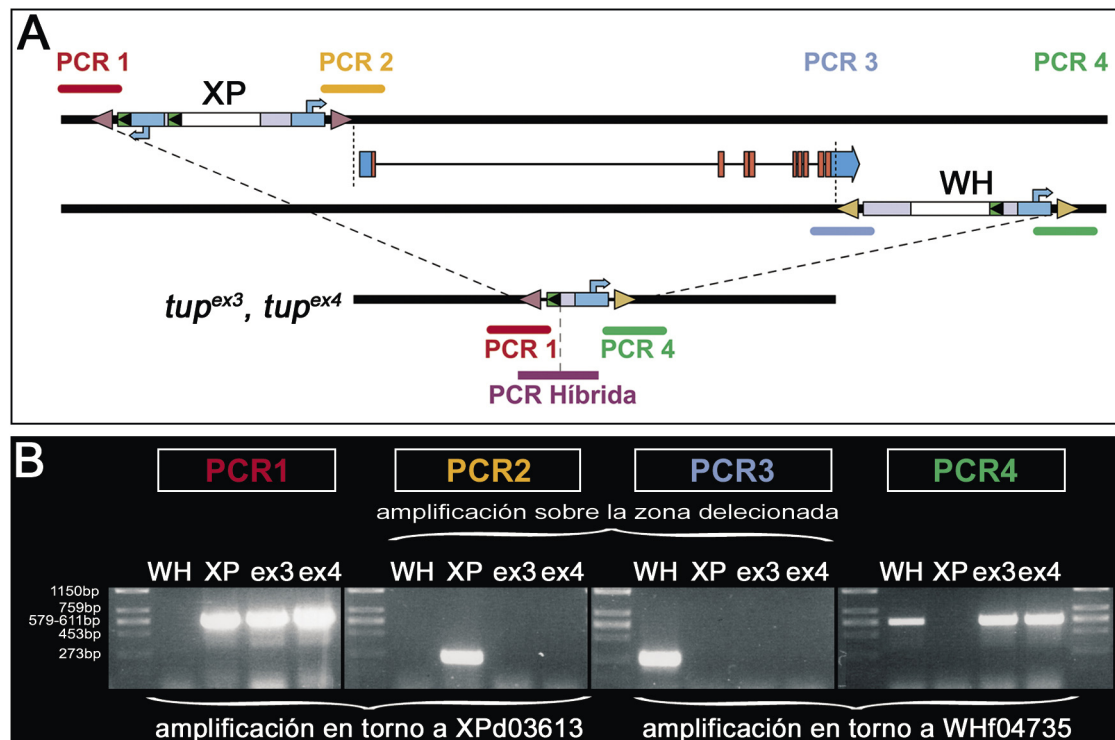
Durante el proceso de caracterización de *tup^{isl-1}*, *tup¹* y *tup²*, surgieron dudas sobre su idoneidad para este estudio. Aceptando que *tup¹* era efectivamente nulo, quería contar con al menos dos alelos nulos independientes para corroborar los fenotipos. Empleé el método de Exelixis/DrosDel para producir deficiencias predeterminadas molecularmente (Parks y cols., 2004; Ryder y cols., 2004). Esta técnica consiste en utilizar sitios de recombinación FRT localizados en transposones insertados en dos puntos distintos, relativamente cercanos, de dos cromosomas homólogos (Fig. M3.A). Si las secuencias FRT están en la misma orientación, la recombinasa FLP puede mediar recombinación entre los dos puntos de ambos cromosomas homólogos, generando una delección en uno de ellos y una duplicación en el otro, que pueden detectarse por la presencia de marcadores *w⁺* o mediante PCR (Golic y Golic, 1996; Parks y cols., 2004; Ryder y cols., 2004; Fig. M4). El procedimiento requiere pocas generaciones y cruces muy sencillos (Fig. M3.B), y se han generado varias colecciones de inserciones portadoras de la FRT que permiten teóricamente realizar decenas de miles de delecciones distintas a la carta (Ryder y cols., 2004; Thibault y cols., 2004).

Las inserciones P{XP} *tup^{d03613}* y PBac{WH} *tup^{f04735}* (Thibault y cols., 2004)



respondían perfectamente a este propósito. Estas inserciones tienen la secuencia FRT en la misma orientación y se encuentran, respectivamente, 171 b antes del sitio de inicio de la transcripción de *tup*, y en el nucleótido 362 del noveno intrón de *tup* (más allá del final de la zona codificante). Así pues, la deleción que podían producir eliminaría completamente la función *tup* sin afectar, en principio, a ningún otro gen, y dejaría un elemento híbrido con las regiones 3' de P{XP} y PBac{WH} (Fig. M4.A).

A partir de estas inserciones y mediante el esquema de cruces representado en la Fig. M3.B, en el primer tubo recuperé siete individuos que habían perdido el rescate *white*, que en este caso sería la primera señal de que se hubiera producido la deleción (Figs. M3.A y M4.A). Cinco de estos individuos eran mutantes *tup* (no complementaban con la *Df(2L)OD15* ni *tup^{isl-1}*). La presencia de los transposones o de sus restos permite comprobar en individuos heterocigóticos que se ha producido la deleción buscada. Para ello, extraje ADN de moscas únicas *Df[w]/CyO* por el método de (Engels y cols., 1990) y amplifiqué por PCR los extremos de los transposones y las regiones genómicas adyacentes (Fig. M4). Seleccioné dos de los cinco candidatos y confirmé la presencia de las deleciones (Fig. M4.B). No conseguí, sin embargo, la confirmación por PCR híbrida. Finalmente, seleccioné la deleción *tup^{ex4}* (*exelixis* #4) como el alelo nulo de referencia.



M4 Generación de la construcción *UAS-tup^{IR}*

Los transgenes productores de ARN interferente son una herramienta útil por cuanto permiten obtener condiciones mutantes controlables temporal, espacial y cuantitativamente, al combinarlos con el sistema Gal4/UAS (ver M7). Así pues, quise disponer de esta posibilidad y generé una construcción *UAS-tup^{IR}* según se describe en (Nagel y cols., 2002), con ligeras modificaciones para hacer todos los pasos de clonaje con la orientación dirigida. Se amplificaron 810 b del ADNc de *tup* y se añadieron en los cebadores las dianas de restricción Sall+BamHI (en 5') y XbaI+KpnI (en 3'). De este modo, la repetición directa se clonó vía BamHI-KpnI, la repetición invertida, vía Sall-XbaI, y el conjunto se introdujo en el vector pUAS-T mediante Sall-KpnI, en todos los casos de manera dirigida. Me cercioré de que el fragmento escogido como molde (intervalo 96-906 en AF145674) no compartía secuencias de más de 18 b con ningún otro gen conocido o predicho de *Drosophila melanogaster* (en el momento en que se diseñó). En cambio, es secuencia estaba presente en los dos ADNc descritos para *tup* hasta la fecha (AF145674 y U89385).

La transformación de embriones se realizó por microinyección como se describe en Rubin y Spradling (1982) y Karess y Rubin (1984). La cepa receptora fue *y, w, y*

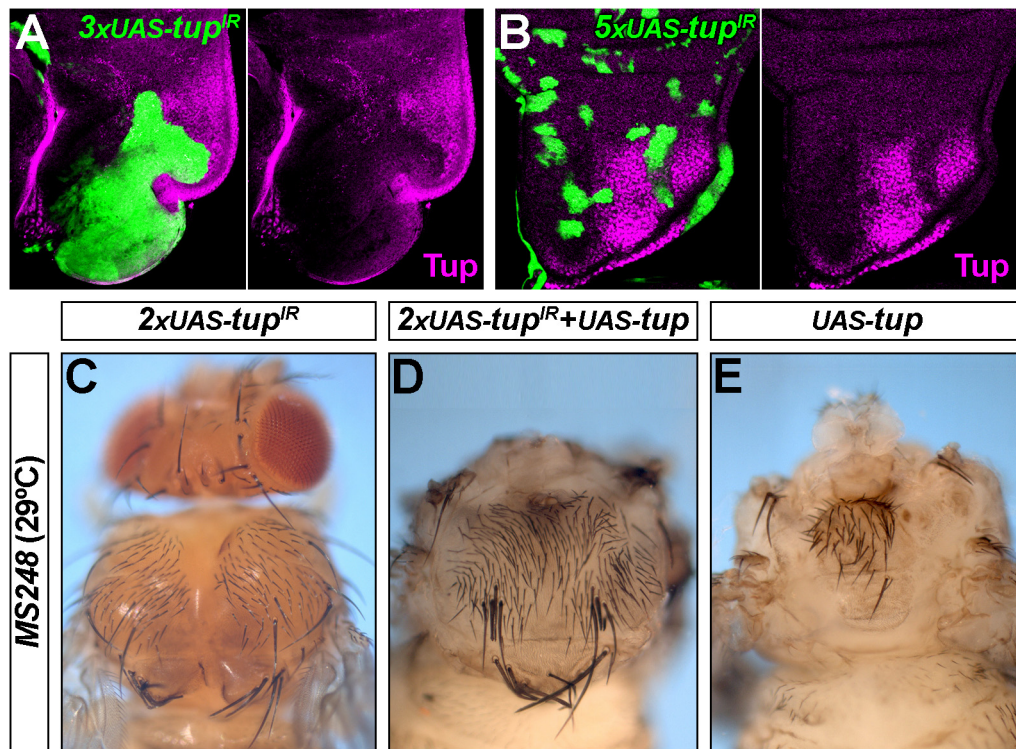


Figura M5. Potencial del transgén *UAS-tup^{IR}* para eliminar la función de *tup*. (A) Clon *3xUAS-tup^{IR}* (*act-Gal4*, 24-48 h DDH), en el que se pierde la expresión de *tup* (morado). (B) Clones *5xUAS-tup^{IR}* (*act-Gal4*, 72-96 h DDH), en los que se pierde la expresión de *tup* (morado). (C-D) Fenotipos adultos asociados a la sobreexpresión de *2xUAS-tup^{IR}* (C), *UAS-tup* (E) y *2xUAS-tup^{IR}+UAS-tup* (D). La sobreexpresión del ARN interferente rescata el fenotipo de sobreexpresión de *UAS-tup*, que resulta en la formación de un notum reducido. La falta de formación de la cabeza no se rescata.

la mezcla de ADN contenía 0,3µg/µl del transgén más 0,15µg/µl de pUCHsΠΔ2-3 (Mullins y cols., 1989) como fuente de transposasa.

Estas construcciones *UAS-tup^{IR}* fueron poco efectivas para eliminar la expresión de *tup*. Para poder llegar a observar la eliminación de la proteína tuve que inducir clones de sobreexpresión en presencia de al menos tres copias del transgén a 29°C (Fig. M5.A). Para eliminar la acumulación de proteína en todas las células de clones tardíos era necesario usar cinco copias del transgén (Fig. M5.B). Sin embargo, dos copias podían contrarrestar alguno de los fenotipos de sobreexpresión fuerte de *UAS-tup* (Fig. M5.C-E), y de mimetizar los fenotipos suaves de *tup* (cierre de epitelios y patrón de órganos sensoriales). Los fenotipos más extremos, que se obtuvieron en clones de sobreexpresión de dos copias del transgén con *arm>y>Gal4:VP16*, correspondieron a las lesiones que inducen remolinos de microquetas alrededor (ver Resultados; Tabla R3) y las protuberancias de cutícula (datos no mostrados y Fig. R5.F).

M5 Obtención del alelo *tup^{IQ3}*

La inserción *tup^{d03613}* se encuentra 171 b antes del inicio del gen. Si el elemento P{XP} dispusiera de un gen marcador, sería posible que las regiones reguladoras que gobiernan la expresión de *tup* actuaran también sobre este gen, convirtiendo a

la inserción en un marcador de la expresión de *tup*. En *Drosophila* se ha comprobado esta capacidad, en la que se basan las mutagénesis de captura de regiones reguladoras (“enhancer trap”; Bellen y cols., 1989; Bier y cols., 1989; O’Kane y Gehring, 1987; Wilson y cols., 1989) y para las que se han diseñado distintas construcciones. Por tanto, decidí forzar un intercambio entre la inserción $P\{XP\} \text{ } tup^{d03613}$ y la inserción $P\{GawB\} \text{ } Gal4.7$, según el método descrito por (de Navas y cols., 2006), que combina la técnica de conversión por transposición dirigida (Sepp y Auld, 1999) con la técnica *UAS-y* (Calleja y cols., 1996). De unos seiscientos machos disgénicos, recuperé siete transposiciones con expresión de *UAS-y+UAS-t*, de las cuales sólo conservé *tup*^{IQ3} por el patrón de expresión (Fig. R3.E). Sin embargo, este patrón no refleja más que una fracción del patrón tardío de expresión de *tup*. A falta de identificar el sitio exacto de la inserción y las lesiones que produce, considero probable que *tup*^{IQ3} sea un alelo viable de *tup*.

M6 Generación de mosaicos genéticos

Recombinación con la inserción FRT_{40A}

Produje los clones de recombinación mitótica mediante la técnica FLP/FRT (Xu y Rubin, 1993). Para usar esta técnica es necesario tener en el mismo cromosoma la mutación deseada con las secuencias correspondientes a su brazo cromosómico. Recombiné meióticamente cada uno de los alelos *tup*¹, *tup*², *tup*^{isl-1} y *tup*^{ex4}, con el elemento defectivo $P\{ry, \text{ } hs\text{-}neo, \text{ } FRT\}$ estabilizado en la región 40A (= FRT_{40A} ; Xu y Rubin, 1993). Seleccioné el recombinante adecuado primero por supervivencia a geneticina (sulfato de G-418 a 1µg/ml diluido en la papilla) y pérdida simultánea del rescate $P\{white^+ \text{-} un1\}_{30C}$ (Flybase ID: FBti0001285) que originalmente estaba en cis con la FRT_{40A} . Después, sucesivamente, por letalidad del cromosoma recombinante, no complementación con la *Df(2L)OD15* ni con algún otro alelo *tup* y, por último, por la recuperación de clones de recombinación mitótica al realizar la técnica FLP/FRT. Se recogieron varios recombinantes para cada alelo. Además conservé los recombinantes procedentes de los cromosomas *tup*¹, *tup*² y *tup*^{isl-1} que no vivían en homocigosis pero complementaban la *Df(2L)OD15*. Presumiblemente, estos recombinantes llevaban mutaciones letales asociadas a los cromosomas originales, separadas ahora del alelo *tup*.

Separación de letales asociados

Por precaución, realicé un análisis de complementación entre los letales asociados que había aislado durante la recombinación con la FRT_{40A} y los recombinantes *tup*, FRT_{40A} de los alelos correspondientes al mismo cromosoma parental. Desafortunadamente

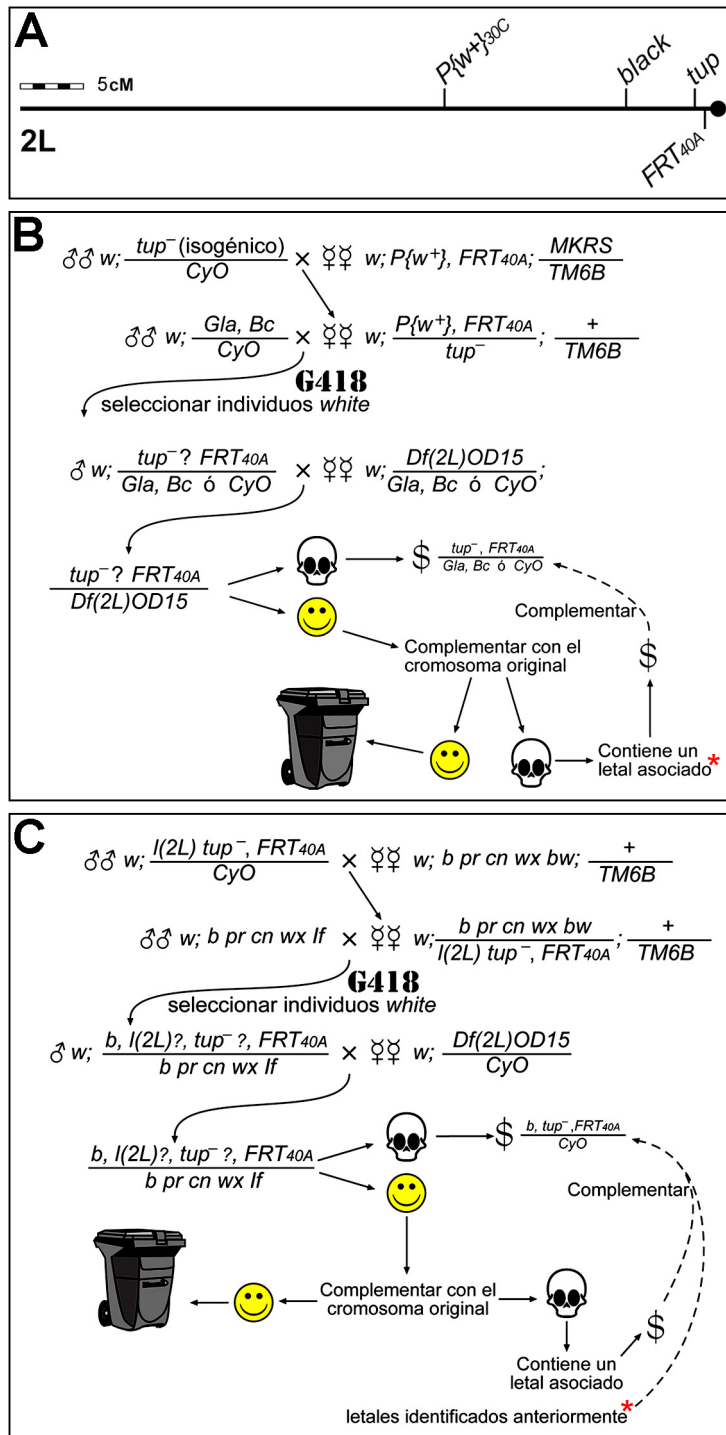


Figura M6. Recombinación con la secuencia FRT y eliminación de los letales asociados. (A) Localización de los diferentes loci empleados en el brazo izquierdo del segundo cromosoma. cM: centimorgan. (B) Esquema de cruces para la recombinación entre la FRT_{40A} y los alelos tup . La presencia de la FRT_{40A} se verificaba por resistencia a geneticina (G-418 a $1\mu\text{g/mL}$), y se seleccionaba la pérdida del marcador distal w^+ para aumentar la eficiencia. Las hembras recombinantes tenían un balanceador del cromosoma tres para aumentar la tasa de recombinación meiótica en los cromosomas no aberrantes. Para eliminar los posibles letales asociados, se comprobó la letalidad de los recombinantes tup^+ (los que complementan con la $Df(2L)OD15$) sobre el cromosoma original. Los que no complementaban se guardaron para verificar si permanecían en los recombinantes $tup FRT_{40A}$. (C) Para eliminar los letales asociados (asumiendo que su posición era distal respecto de tup) se incorporó el marcador distal *black* (*b*) en presencia de geneticina. Se seleccionaron los recombinantes *b, tup, FRT_{40A}* que complementaron con los letales aislados durante el proceso.

comprobé que estos letales seguían presentes en los recombinantes tup, FRT_{40A} . En el caso de tup^2 se trataba de una mutación letal celular y, en el caso de tup^{isl-1} , era una mutación presumiblemente inductora de apoptosis en el primordio de ala; no pude averiguar detalles sobre el letal asociado a tup^1 . Esto evidentemente impedía realizar un análisis clonal informativo con estos alelos.

Para corregir esta situación, separé los letales asociados del alelo tup y la FRT_{40A} por recombinación meiótica con un cromosoma marcador múltiple (*b, pr, cn, wx^{wxt}, bw*). Seleccioné sucesivamente los recombinantes que sobrevivieran en presencia de

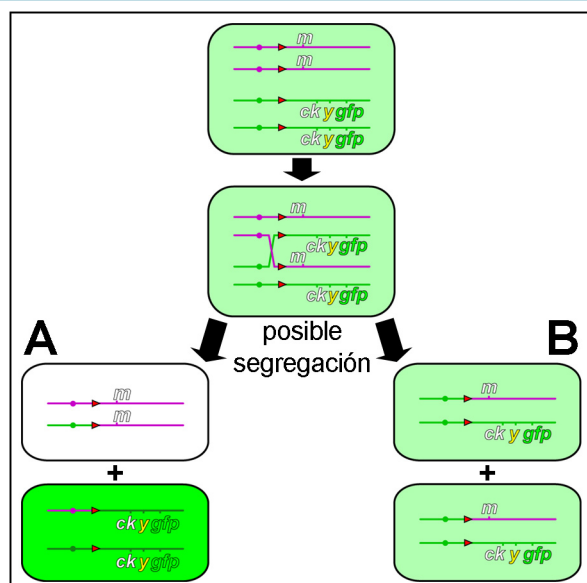
geneticina, hubieran incorporado el marcador recesivo *black* (*b*, distal con respecto a *tup*; Fig. M6.A), no complementarían con la *Df(2L)OD15* ni con alguno de los otros alelos puntuales de *tup*, sí complementarían, en cambio, el letal aislado de su mismo cromosoma parental, y permitirían obtener clones mediante la técnica FLP/FRT. Un esquema de los cruces mencionados en esta sección se detalla en la Fig. M6.B-C. Como resultado, obtuve recombinantes *b*, *tup*¹ -ó *tup*² ó *tup*^{isl-1}-, *FRT*_{40A}, libres de los respectivos letales asociados.

Análisis clonal

El análisis clonal es una técnica para generar individuos quiméricos, en los que unas células son mutantes para el gen de interés mientras que las células del entorno son silvestres (heterozigóticas u homozigóticas). Esta situación se obtiene mediante recombinación mitótica, que consiste en forzar el intercambio de regiones equivalentes entre cromátidas homólogas en una célula en división. Esto conlleva la posibilidad de que co-segreden cromátidas que, para la región intercambiada, son idénticas (Fig. M7). Si la célula madre es heterozigótica para un locus concreto, la recombinación mitótica de esa región puede producir dos células hijas homozigóticas, una para cada uno de los alelos que porta la madre (Fig. M7). En el caso que nos ocupa, una célula hija dará lugar al clon mutante para *tup*, y la otra al clon homozigótico silvestre, o clon gemelo. Esta circunstancia se aprovecha tanto para eludir la letalidad embrionaria de una mutación, y poder estudiarla así en etapas posteriores, como para estudiar la confrontación entre células con distinto genotipo.

Obtuve clones mutantes mediante la técnica FLP/FRT (Xu y Rubin, 1993), así como clones de sobreexpresión por escisión (=flip-out; Ito y cols., 1997) y la variante combinada de los dos, MARCM (=mosaic analysis with a repressible cell marker; Lee y Luo, 1999). Todas ellas se basan en la expresión de la recombinasa FLP mediante un promotor inducible por tratamiento a 37°C, que actúa sobre sus secuencias diana FRT. También se utilizó la técnica *Minute*⁺ (Morata y Ripoll, 1975), que permite obtener clones mutantes muy grandes al

Figura M7. La recombinación mitótica. Durante la división celular, cuando se ha replicado el material genético, la recombinación mediada por la Flp sobre secuencias FRT en trans permite intercambiar cromátidas homólogas. Así, durante la segregación de estas cromátidas, puede suceder que una célula hija herede las dos copias mutantes de un gen *m* (caso A). En tal caso, si el cromosoma homólogo tenía genes marcadores, como *yellow*, *crinkled* o *gfp*, se podrá reconocer el genotipo del clon resultante en la cutícula o mediante la intensidad de la fluorescencia. (Como se indica en el esquema: fuerte para las células del clon gemelo, nula para las células mutantes, e intermedia para las heterozigóticas).



dotar a sus células de una ventaja proliferativa con respecto a las adyacentes, todas heterocigóticas (la célula homocigótica *Minute* muere). Los resultados obtenidos mediante esta técnica no difieren del análisis clonal convencional y no se muestran. Además, para dirigir la inducción de clones en una región determinada, se utilizaron transgenes *UAS-Flp* con la línea Gal4 deseada (*Ubx-Gal4^{LDN}*, *MS248* o *pnr^{MD237}*).

Para obtener clones de falta de función, induje la expresión del transgén *hs-Flp* por incubación de las larvas de la edad deseada a 37°C durante 30-90 min, según los casos. Para producir clones de escisión, realicé la inducción durante 15-20 min a 34°C.

M7 Sobreexpresión mediante el método GAL4/UAS

El método GAL4/UAS (Brand y Perrimon, 1993) permite activar la expresión de transgenes de manera controlada espacial y temporalmente. El sistema requiere dos cepas transgénicas. La primera expresa la proteína de levaduras Gal4 en un patrón determinado; este patrón depende, bien del entorno genómico del sitio de inserción del transposón ("enhancer trap"), o bien de secuencias reguladoras incluidas en el propio transposón. La segunda cepa lleva un transgén bajo el control de la secuencia reguladora UAS, que responde positivamente a la proteína Gal4. Cruzando estas dos líneas, se obtiene una descendencia que expresa el transgén de interés en el patrón spatiotemporal que determine la línea Gal4 utilizada (Fig. M8).

De esta técnica se han ido desarrollando diversas variantes, a menudo combinadas con la técnica FLP/FRT, como la técnica MARCM o la de los clones de sobreexpresión por escisión. Existen varias revisiones que explican, con más detalle del que aquí es procedente, las diversas técnicas de manipulación genética que permite *Drosophila melanogaster*, relacionadas especialmente con esta sección y la anterior (Blair, 2003; Duffy, 2002; Ryder y Russell, 2003).

Un refinamiento de la técnica Gal4/UAS que sí es conveniente explicar consiste en incluir un tercer transposón que expresa, bajo el control del promotor de tubulina, una variante termosensible de la proteína de levaduras Gal80 (*tub-Gal80^{ts}*; McGuire y cols., 2003). La proteína Gal80 impide eficientemente el funcionamiento de la Gal4; así, mientras las moscas se mantengan a la temperatura permisiva (18°C), la Gal80 no permite que la Gal4 active el transgén UAS. Al incubar las moscas a 30°C, la proteína Gal80^{ts} se inactiva y la Gal4 realiza su función. De este modo, al patrón de expresión de Gal4 puede añadirse una restricción controlable ad libitum. Esta fue la manera en que realicé las sobreexpresiones de *Dad* y *mkp3* en discos de segundo estadio larvario: crucé machos, homocigóticos para el transgén *UAS-Dad* o la inserción *mkp3^{M76}* (en la que un elemento *P{GS}* que aloja la secuencia UAS puede dirigir la expresión del gen *mkp3*), con hembras *ptc^{559.1}-Gal4*, *UAS-GFP / SM6a-TM6b / tub-Gal80^{ts}*. La progenie creció a la

temperatura permisiva para la Gal80^{ts} 72-96 h (hasta principios/ mediados del segundo estadio), luego la mantuve a 29°C durante al menos 24 h e inmediatamente después procedí a la disección. Los detalles del resto de las sobreexpresiones se explican en los pies de figura.

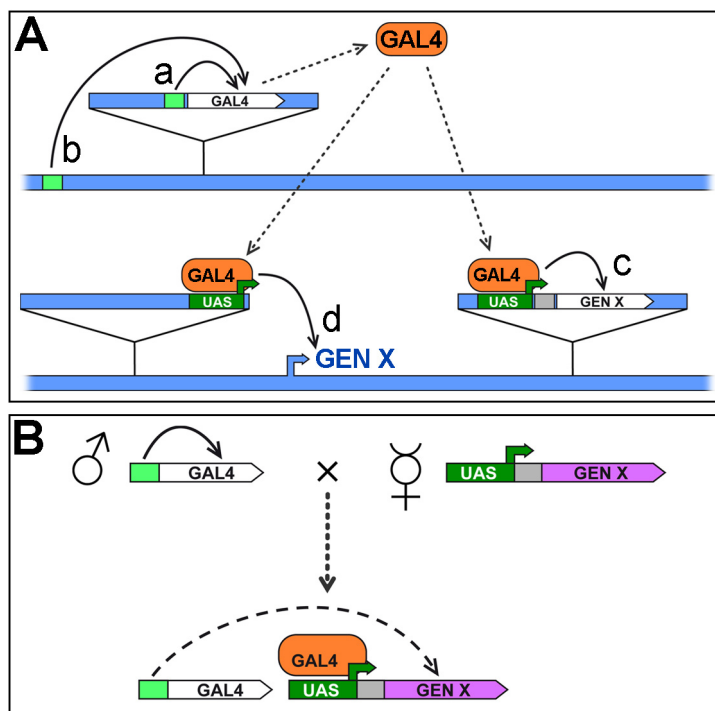


Figura M8. El sistema Gal4/UAS.
(A) Un transposón que lleve el gen *Gal4* bajo el control de una secuencia reguladora (caja verde clara) incluida en el transposón (a) o que actúe desde el ADN genómico adyacente (b), producirá proteína Gal4 en las condiciones determinadas por dicha secuencia reguladora. Esta proteína, a su vez, regulará positivamente a cualquier gen x, ya sea un gen incluido en un transposón bajo el control de la secuencia UAS (caja y flecha verde oscuro, c) o un gen endógeno (flecha azul) hacia el que se orienta la secuencia UAS incluida en el extremo de un transposón (d).
(B) El sistema Gal4-UAS es binario, es decir, el transgén *Gal4* y el transgén UAS-x están en estirpes independientes, que se cruzan para producir la sobreexpresión en la descendencia.

M8 Biología molecular

Técnica de ADN recombinante

Las técnicas de clonaje molecular se realizaron según (Sambrook y cols., 1989).

Secuenciación y programas de análisis

La secuenciación corrió a cargo del desaparecido Servicio de Secuenciación del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" y, más tarde, del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), principalmente mediante secuenciación automática con electroforesis capilar ABI Prism (Applied Biosystems). El análisis de los cromatogramas obtenidos en la secuenciación, así como el manejo general de secuencias, se realizó con los programas SeqMan (Dnastar) y Vector NTI (Invitrogen).

Northern Blot

El análisis de los transcritos de *tup* se realizó mediante protocolos estándar de Northern Blot. Sólo cabe destacar que el único tipo de sonda que permitió la detección de estos transcritos fue la ribosonda marcada radioactivamente con ^{32}P (Kit T3/T7 de Roche + $\alpha^{32}\text{P}$ rCTP de Amersham); sondas de ADN marcadas con digoxigenina (Kit de Roche) o con ^{32}P (Rediprime+Redivue $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP; Amersham) no dieron suficiente señal. El molde de la sonda fue el cDNA AF145674.

M9 Morfología de estructuras adultas

Montaje y fotografía

Fotografié los tóraces adultos montados o en inmersión. En el primer caso, moscas guardadas en Strong Happening (SH; etanol 70%:glicerol 87% 1:3) se lavaban en etanol, luego en agua, se diseccionaban en agua y se hervían en KOH 10% (p/v) durante 2 min. Después se lavaban en agua abundante y se extraía con pinzas la musculatura de vuelo, para luego montarlas en ácido láctico:etanol (6:5) o en Euparal (ASCO), tras lo cual se aplastaban y sellaban con laca de uñas (Christian Dior). Según el fenotipo que se quisiera observar, también se montaban sin aplastar en Euparal o Epon, levantando el cubreobjetos con fragmentos de otros cubreobjetos (a dos o tres alturas) para mantener el volumen de la preparación. Después se dejaban varias horas a 60°C para endurecer la preparación. Estas moscas se fotografiaron con una cámara DCF300 (Leica) en un microscopio Axiophot (Zeiss). En el segundo caso, las moscas se sumergían en PBS en una placa de Petri de 40mm y se sujetaban en una hendidura practicada en un fondo de PBS-agar 1%. Estas moscas se fotografiaban en el microscopio mencionado, o con una cámara digital doméstica en un microscopio estereoscópico MZ APO (Leica).

En la práctica totalidad de los casos, debido a las limitaciones de profundidad de campo, se fotografiaron varios planos focales (entre 2 y 7 generalmente, en torno a 20 en algunos casos), que se compusieron después con el programa Photoshop (Adobe).

Microscopía electrónica de barrido

La preparación de las muestras varió según el caso. En ocasiones se usaron individuos vivos, decapitados inmediatamente antes de la metalización. El resto de las veces, individuos conservados en SH fueron rehidratados, fijados durante 2 h (glutaraldehído al 4% en PBS), y deshidratados con etanol, antes del secado de punto crítico y la metalización.

El secado de punto crítico, la metalización y la captura de imágenes se realizó

en el SIdI de la UAM. Para los individuos que fueron desecados se usó un equipo de punto crítico Emitech K850. Todas las muestras se recubrieron en un metalizador de oro BioRad SC502. Los microscopios utilizados fueron los modelos Philips XL-30 e Hitachi S-3000N.

M10 Detección de la expresión génica

Inmunodetección en tejidos

Las tinciones mediante anticuerpos específicos se realizaron, en discos imaginales, esencialmente como se describe en Cubas y cols. (1991). En el caso de *Apterous*, tras la fijación se realizaron cuatro incubaciones sucesivas en metanol, PBS, metanol y PBS, de un minuto cada una; después se comenzó el primer bloqueo en PBS-TritonX100 0,3%-BSA 1%. Todo el proceso, desde la disección hasta los lavados del anticuerpo primario, se hizo en hielo o a 4°C. El montaje en todos los casos se hizo en mowiol (Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”).

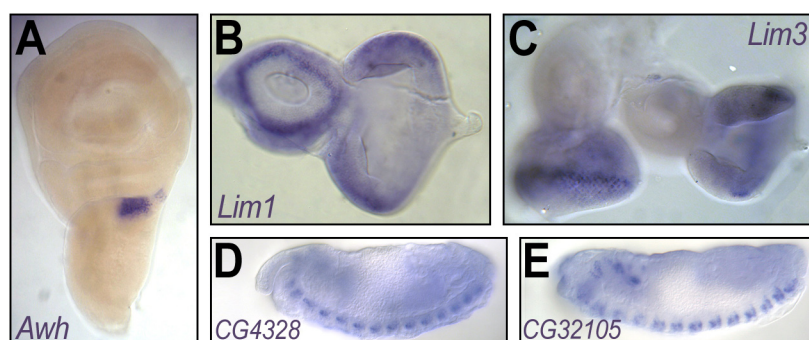
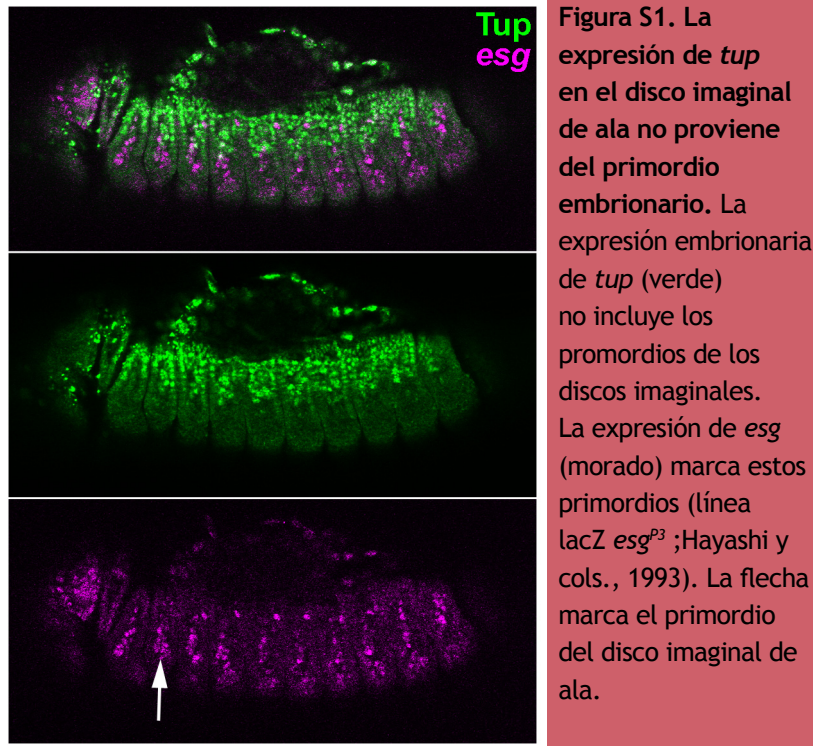
Para la inmunodetección efectuada en embriones, éstos se fijaron como se describe en Goriely y cols. (1991) y se procesaron básicamente como en Ruiz-Gómez y Ghysen (1993), añadiendo para el anti-Tup un paso de amplificación con tiramida (TSA Fluorescein System, Perkin Elmer) tal como describe el fabricante. El montaje se hizo en Vectashield (Vector Laboratories).

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-Ap de rata (1:200; Lundgren y cols., 1995), anti-Ara/Caup (1:200; Diez del Corral y cols., 1999), anti- β -Gal de conejo (1:20.000; Cappel) o de ratón (1:1.000-1:5.000; Jackson ImmunoResearch), anti-DE-Cadherina (mAb DCAD1 1:20; Oda y cols., 1994), anti-Eyg de cobaya (1:200; Aldaz y cols., 2003), anti-Nub de ratón (1:20; Averof y Cohen, 1997), anti-Nub de conejo (regalo de Javier Terriente), anti-Msh (1:200; McDonald y cols., 1998), anti-Sal de conejo (1:200; de Celis y cols., 1999), anti-Tsh de conejo (1:2000; Ng y cols., 1996), anti-Tup de ratón (mAb 40.3A4 y 40.2D6 del DSHB, 1:20-1:100), anti-Tup de rata (1:100-1:1.000; Broihier y Skeath, 2002), anti-Ush de conejo (1:500; Fossett y cols., 2001), anti-Wg de ratón (mAb 4D9 1:50; Brook y Cohen, 1996), anti-Zfh-2 de rata (1:500; Whitworth y Russell, 2003). Los anticuerpos secundarios y la faloidina conjugada con rhodamina se compraron a Molecular Probes o Jackson ImmunoResearch. Las imágenes se capturaron mediante microscopía confocal en un equipo Microradiance (BioRad) acoplado a un microscopio Axioskop2 (Zeiss) o en un equipo LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), en el Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

Hibridación *in situ*

Las hibridaciones *in situ* en discos imaginales se realizaron tal como se describe en Tautz y Pfeifle (1989) con las modificaciones de Cubas y cols. (1991). Los discos se montaron en Bálsamo de Canadá y se fotografiaron con una cámara DCF300 (Leica) en un microscopio Axiophot (Zeiss).

figuras suplementarias



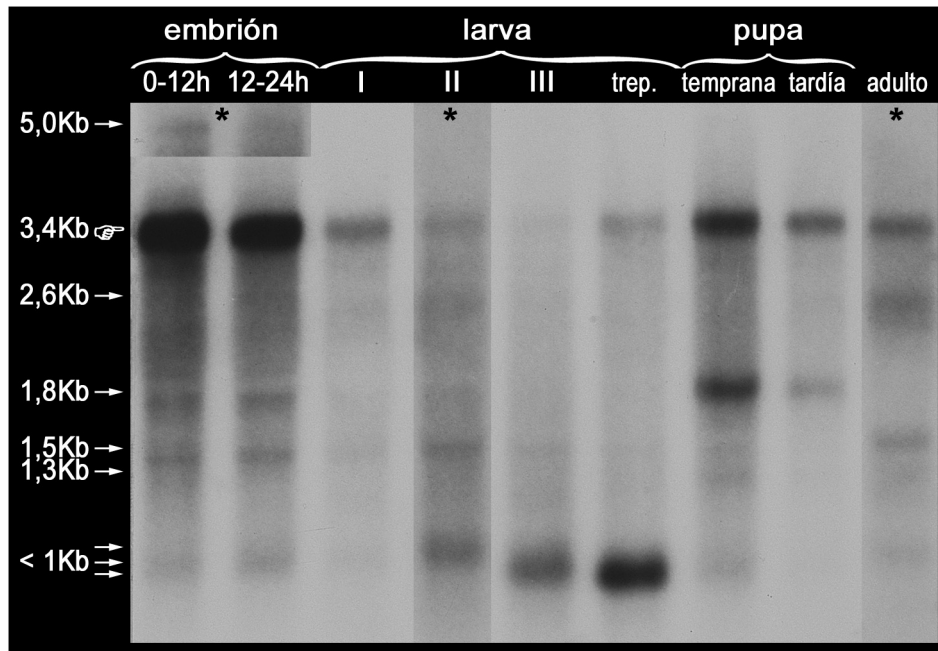


Figura S3. Northern blot de *tup* en distintos estadios de desarrollo. Northern blot realizado con una ribosonda radioactiva antisentido contra un ADNc de *tup*. En la figura se indican los tamaños de las diferentes formas del ARNm de *tup* (con un dedo la del tamaño correspondiente a los ADNc conocidos) y los estadios de desarrollo en que se detectan. La membrana se expuso durante 28 h. Los asteriscos indican parches de la membrana cuya señal corresponde a una exposición de 66 h.

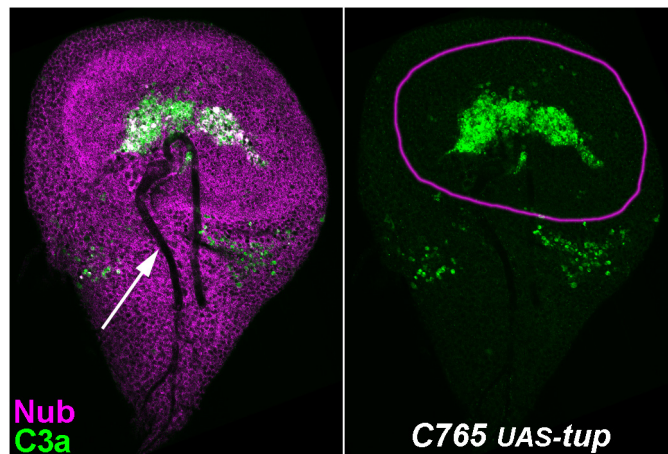


Figura S4. Inducción de apoptosis en el territorio de ala por sobreexpresión de *UAS-tup*. La detección de Caspasa 3 activada (C3a, verde) revela que la sobreexpresión de *UAS-tup* induce apoptosis en el territorio de ala y posiblemente también en el de axila dorsal. Las células apoptóticas se encuentran cerca del plano basal del epitelio, como indica la tráquea (flecha blanca). La tinción con anti-Nub (morado) permite identificar los límites del territorio de ala (contorno morado).

Figura S5. Sobreexpresiones con la línea C765. Los genotipos se indican en la figura. (A) Vista de un individuo adulto similar a la de la Fig. R18.D. La sobreexpresión de *UAS-dTCF^{AN}* con la línea C765 no induce la formación de tejido ectópico de notum en el ala ni la pleura (flecha blanca), pero reduce el tamaño del ala (flecha negra). (B-D) Vistas dorsal de individuos adultos. La sobreexpresión conjunta de *UAS-ara* y *UAS-tup* expande distalmente el tejido de cápsula cefálica entre las cerdas oclares (punta de flecha negra) y las verticales (punta de flecha blanca). (El individuo en C es también *Irregular facets*).

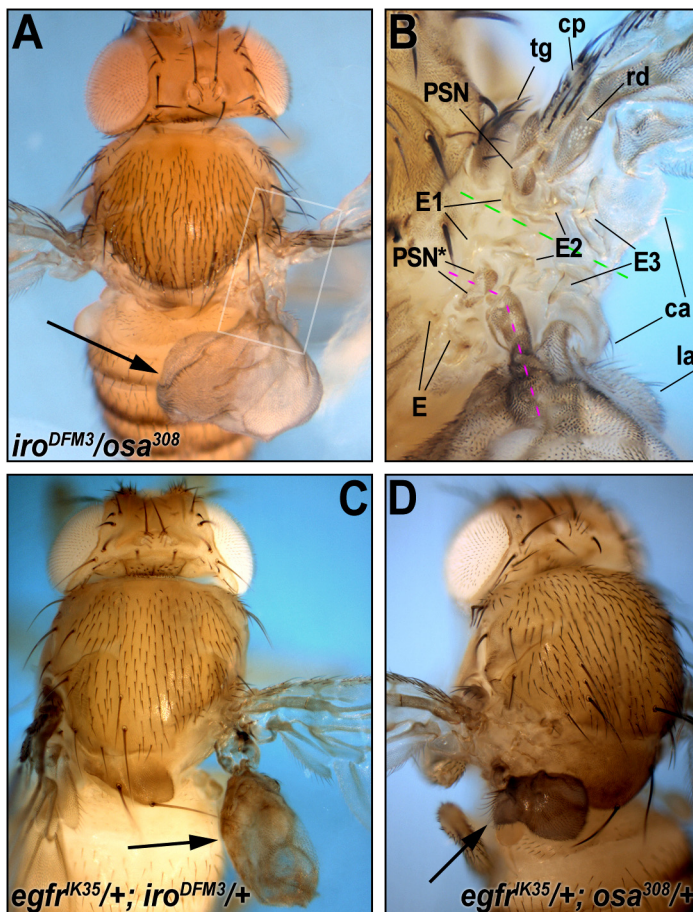
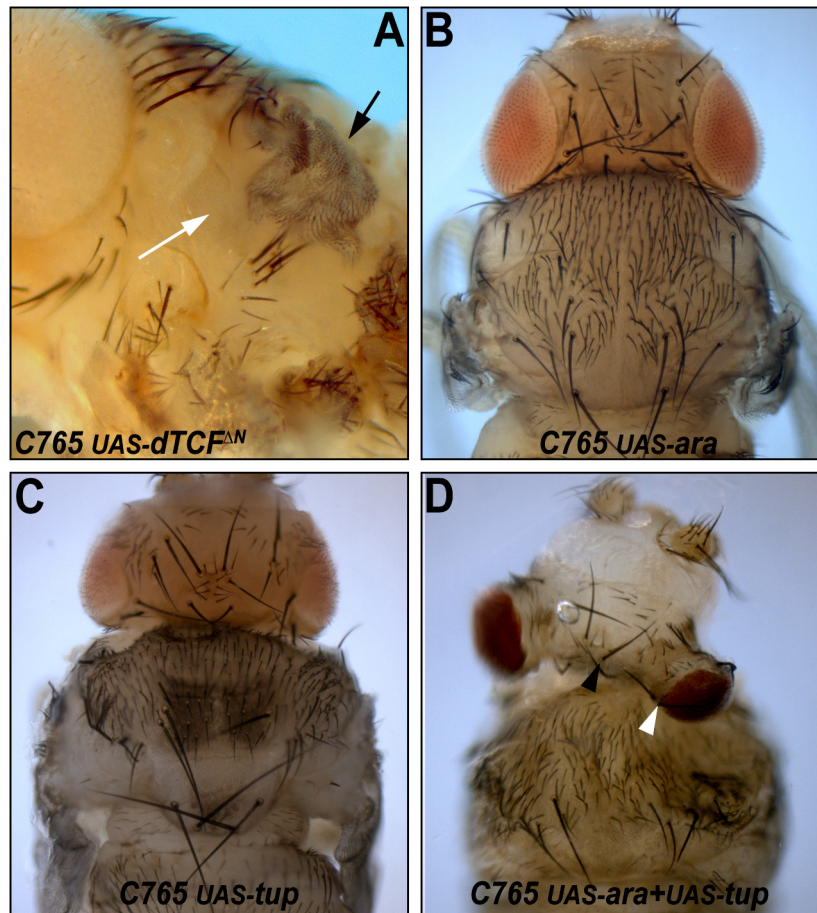


Figura S6. Interacciones genéticas entre el C-Iro y la vía del EGFR. Los genotipos se indican en la figura. (A-D) Fenotipo de transformación de la zona lateral y posterior del notum en axila y ala (flechas), en individuos transheterozigotos para distintas combinaciones de un alelo nulo del *egfr*, una deficiencia completa del C-Iro y un alelo nulo de *osa* (un factor de transcripción involucrado en la señalización del EGFR; A. Terriente y J. F. de Celis, comunicación personal). En B se muestra ampliada la región enmarcada en A y se indican las estructuras reconocibles, con la nomenclatura de la Fig. R4.F (no se distingue entre las estructuras ectópicas y endógenas salvo en la PSN, para la que las ectópicas están indicadas como PSN*). La línea discontinua verde indica el eje de simetría entre la axila endógena y la ectópica. La línea discontinua morada indica un aparente eje de simetría en la axila ectópica; la PSN parece duplicada en torno a este eje, y en la parte posterior respecto de esta PSN hay esclerotizaciones malformadas (E). rd, radio dorsal. cp, costa proximal. la, lóbulo alar.

Tabla S1. Lista de interacciones genéticas exploradas entre *tup* y mutaciones del C-Iro y de genes del *trxG* y del PcG.

Genotipo		<i>tup^{ex4}</i> / +	<i>tup^{d03613}</i>
PcG	<i>Pc³</i> / +	×	NR
	<i>Pc^{XT109}</i> / +	×	NR
	<i>scr, Pcl, esc</i> / +	×	NR
trxG	<i>trx^{E2}</i> / +	×	NR
	<i>Trl^{R85}</i> / +	×	× ^(§)
	<i>brm²</i> / +	×	NR
	<i>brm², Antp²³</i> / +	×	× ^(§)
	<i>osa³⁰⁸</i> / +	×	NR
	<i>lawc^{P1}</i>	×	NR
C-Iro	<i>iro^{DFM3}</i> / + ^(¶)	×	×
	<i>iro^{DFM2}</i> / <i>iro¹</i>	×	×

§ - Se reduce la viabilidad de la condición *tup^{d03613}*.

¶ - Además del transheterozigoto, se probó a inducir clones homocigóticos *tup^{ex4}* en este fondo, sin modificación de los fenotipos asociados a los clones *tup*.

NR- No realizado.

contenido del dvd

El DVD que acompaña esta tesis contiene:

- Una copia de la tesis en formato PDF y modo de color RGB.
- Las figuras de la tesis en formato JPG y modo de color RGB.
- Una recopilación en PDF de la mayoría de la bibliografía citada.
- Las publicaciones del doctorando.
- Un archivo con las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la tesis.

anexo ii

A continuación se reproducen las publicaciones del doctorando:

de Navascués, J. y Modolell, J. (2007). *tailup*, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in *Drosophila* dorsal mesothorax specification. *Development* **134**, 1779-88.

Villa-Cuesta, E., de Navascués, J., Ruiz-Gómez, M., Díez del Corral, R., Domínguez, M., de Celis, J. F. y Modolell, J. (2003). *Tufted* is a gain-of-function allele that promotes ectopic expression of the proneural gene *amos* in *Drosophila*. *Genetics* **163**, 1403-12.

Tufted* Is a Gain-of-Function Allele That Promotes Ectopic Expression of the Proneural Gene *amos* in *Drosophila

Eugenia Villa-Cuesta, Joaquín de Navascués, Mar Ruiz-Gómez, Ruth Díez del Corral,¹ María Domínguez,² José Félix de Celis and Juan Modolell³

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC and Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Manuscript received August 21, 2002

Accepted for publication November 11, 2002

ABSTRACT

The *Tufted*¹ (*Tft*¹) dominant mutation promotes the generation of ectopic bristles (macrochaetae) in the dorsal mesothorax of *Drosophila*. Here we show that *Tft*¹ corresponds to a gain-of-function allele of the proneural gene *amos* that is associated with a chromosomal aberration at 36F–37A. This causes ectopic expression of *amos* in large domains of the lateral-dorsal embryonic ectoderm, which results in supernumerary neurons of the PNS, and in the notum region of the third instar imaginal wing, which gives rise to the mesothoracic extra bristles. Revertants of *Tft*¹, which lack ectopic neurons and bristles, do not show ectopic expression of *amos*. One revertant is a loss-of-function allele of *amos* and has a recessive phenotype in the embryonic PNS. Our results suggest that both normal and ectopic *Tft*¹ bristles are generated following similar rules, and both are subjected to Notch-mediated lateral inhibition. The ability of *Tft*¹ bristles to appear close together may be due to *amos* having a stronger proneural capacity than that of other proneural genes like *asense* and *scute*. This ability might be related to the wild-type function of *amos* in promoting development of large clusters of closely spaced olfactory sensilla.

DEVELOPMENT of the peripheral nervous system of *Drosophila* starts by the expression of proneural genes in groups of cells of the embryonic ectoderm and the imaginal discs (reviewed in CAMPUZANO and MODELELL 1992; GHYSEN *et al.* 1993; JAN and JAN 1993). Proneural genes confer to cells the capacity to become sensory organ precursors (SOPs). However, this neural potential is not realized in all cells of each proneural group, since the proneural genes also promote negative interactions among the cells of each cluster (lateral inhibition) that are mediated by the Notch (N) signaling pathway (reviewed in ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.* 1999). This pathway antagonizes a critical step in SOP commitment, namely, the triggering of proneural gene self-stimulation that allows accumulation of large amounts of proneural protein in the cell that becomes an SOP, presumably to implement a neural differentiation program (CULÍ and MODELELL 1998). The end result of the neural-promoting ability of the proneural proteins and the antineurogenic (proepidermic) action of the N pathway is that only one or a few cells of each proneural cluster become SOPs.

All the known *Drosophila* proneural genes encode

transcription factors of the bHLH family (reviewed in JAN and JAN 1993; JARMAN *et al.* 1993; GOULDING *et al.* 2000; HUANG *et al.* 2000). Of the four members of the *achaete-scute* complex (AS-C), *achaete* (*ac*) and *scute* (*sc*) are most important for the development of external SOs, like the bristles and sensilla campaniformia and trichoidea of the head, notum, legs, and wings, and a subset of larval SOs (GARCÍA-BELLIDO 1979; DAMBLY-CHAUDIÈRE and GHYSEN 1987; CAMPUZANO and MODELELL 1992; RUIZ-GÓMEZ and GHYSEN 1993). *asense* (*ase*) is most important for the development of the tergite bristles, the anterior wing margin bristles and another subset of larval external SOs (DAMBLY-CHAUDIÈRE and GHYSEN 1987; MARÍ-BECCA *et al.* 1991; BRAND *et al.* 1993; DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993; JARMAN *et al.* 1993). In addition, *ase* is expressed in all SOPs and because of this it has also been categorized as a panneural gene. The fourth member of the AS-C, the *lethal of scute* (*lsc*) gene, is mostly concerned with the development of the central nervous system (CNS; JIMÉNEZ and CAMPOS-ORTEGA 1979; MARTÍN-BERMUDO *et al.* 1991). Three other known proneural genes are found outside the AS-C. They are *atonal* (*ato*), which promotes development of the chordotonal organs and photoreceptors (JARMAN *et al.* 1993, 1994); *amos* (*absent solo-MD neurons and olfactory sensilla*), which is necessary for the development of some embryonic multidendritic neurons and two types of olfactory SOs of the antenna (GOULDING *et al.* 2000; HUANG *et al.* 2000); and *daughterless* (*da*), which encodes the bHLH heterodimerizing partner of all the proneural proteins and is a requisite for their

¹Present address: Wellcome Trust Biocentre, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, United Kingdom.

²Present address: Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández, 03550 San Juan, Alicante, Spain.

³Corresponding author: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC and Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail: jmodol@cbm.uam.es

function (CAUDY *et al.* 1988; DAMBLY-CHAUDIÈRE *et al.* 1988; MURRE *et al.* 1989).

The gene *Tufted* (*Tft*) is a candidate for another proneural gene or for a regulator of known proneural genes. *Tft* is known from only a single dominant gain-of-function allele (*Tft*¹) that promotes the development of a large number of extra bristles in the posterior dorsal mesothorax and at the metanotum (LINDSLEY and ZIMM 1992). The removal of *ac*, *sc*, and *l'sc* in the *Df(1)sc*¹⁹ does not suppress the *Tft*¹ phenotype, but the additional removal of *ase* (*Df(1)260-1*) suppresses it (A. GARCÍA-BELLIDO, personal communication cited in CAMPUZANO *et al.* 1985). Moreover, the overexpression of *ase* can mimic the *Tft*¹ phenotype (DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993). This has led to the suggestion that *Tft* might be a transregulator of *ase* or that it might regulate another proneural gene that requires *ase* for development of extra bristles.

Tft has been genetically mapped to chromosomal position 37A+ (LINDSLEY and ZIMM 1992). The recent cloning and characterization of *amos* (GOULDING *et al.* 2000; HUANG *et al.* 2000), located at chromosomal subdivision 36F2-6/37A1-2, has opened the possibility that *Tft* may be an allele of *amos*. Here we show that this is indeed the case. *Tft*¹ appears to be associated with a rearrangement at the 36F chromosomal region that causes *amos* misexpression in the embryo and imaginal discs. This misexpression accounts for the *Tft*¹ phenotype. Similar conclusions have been reached by LAI (2003) in the accompanying article in this issue.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks: The following stocks were used: *ase*¹, *In(1)sc*^{10.1}, *Tft*¹, and *Df(2)M36F-S6* (described in <http://flybase.bio.indiana.edu:82>); *UAS-sc* (PARRAS *et al.* 1996), *UAS-ase* (BRAND and DORMAND 1995), and *UAS-amos* (GOULDING *et al.* 2000); and Gal4 line *C765* (GÓMEZ-SKARMETA *et al.* 1996). The SOP cell-specific *lacZ* reporter transgene *neuralized (neu)-lacZ* (line *A101.IF3*) is described in HUANG *et al.* (1991). *Tft*¹ revertants *Tft*^{RM9} and *Tft*^{RM11} were induced by X rays (3000 rad) on *Tft*¹/*CyO* males and detected by the loss of the *Tft*¹ dominant phenotype in the F₁ generation.

Histochemistry: Hybridization *in situ* to detect specific mRNAs in embryos or imaginal disc whole mounts was performed as described by GONZÁLEZ-CRESPO and LEVINE (1993), using antisense RNA (*amos*, *ase*) or DNA [*E(spl)-m8*] digoxigenin-labeled probes. Antibody stainings of imaginal discs were as in CUBAS *et al.* (1991). Primary antibodies were rabbit anti-β-galactosidase (Cappel), MAb 22C10 (FUJITA *et al.* 1982), anti-Cut (Developmental Studies Hybridoma Bank), and anti-Achaete (SKEATH and CARROLL 1991). Secondary antibodies were from Amersham. Polytene chromosomes were prepared as in ASHBURNER (1989). They were hybridized with biotinylated λ phage clones (ENGELS *et al.* 1986) harboring inserts of the *amos* genomic region and fluorescently stained with avidin-Cy3 and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

RESULTS

The *Tft*¹ mutant phenotype: The extra bristles characteristic of *Tft*¹ heterozygous or homozygous flies appear mainly in the postalar, dorsocentral, and scutellar regions of the dorsal mesothorax (posterior notum; LINDSLEY and ZIMM 1992 and Figure 1, A–C). Ectopic bristles and other sensory organs are also formed in the metanotum in a position dorsal to the halteres (Figure 1F). In contrast to other mutations that also promote formation of extra bristles such as *extramacrochaetae* (*emc*) or *hairy* (BOTAS *et al.* 1982), the extra bristles of *Tft*¹/+ or *Tft*¹ homozygous flies can develop very close together, forming tufts, and in some cases several tormogens can be fused to each other (Figure 1, B and C, and data not shown). These phenotypes are cell autonomous in mosaics (ARNHEIM 1967). In addition, homozygous and heterozygous *Tft*¹ flies have a reduced scutellum, probably due to the change of epidermal cells into a neural fate, and very frequently lack the scutum-scutellar suture.

To discriminate whether ectopic *Tft* bristles are formed following the same rules as for wild-type bristles, we first carried out a cell lineage analysis of the mutant thorax. Mitotic recombination clones were induced in *y*¹ *f*^{36a}/+; *Tft*¹/+ larvae, and a total of 15 *yf* clones were studied in the thorax. In all cases the clones included bristles located at different extant macrochaetae positions and the mosaic borders separated bristles located very close together in the same position. This indicates that the SOPs of the ectopic bristles are singled out, as happens with normal bristles (GARCÍA-BELLIDO and MERRIAM 1971), from neighboring cells not clonally related; that is, they are not derived from a common precursor.

The singling out of mutant SOPs was directly visualized in imaginal discs using the SOP early marker *neu-lacZ* (A101) (Figure 2H). We observed that in the presumptive posterior notum, extra SOPs were generated in large numbers and very close together. Moreover, the appearance of ectopic SOPs was sequential and occurred concomitantly with the normal SOPs. Thus, it seems that either the proneural activity at the posterior notum is increased or the normal lateral inhibition mechanisms antagonizing proneural activity are inefficient in that region of the presumptive notum. The contribution of the N signaling pathway was analyzed in genetic combinations of *Tft*¹ and mutations in members of this pathway. The number of ectopic bristles in *Tft* heterozygous flies was increased by mutations in *Delta*, the N ligand, and it was reduced in the N gain-of-function *Abruptex* (*Ax*) and in *Hairless* (*H*) alleles (Table 1). Moreover, the overexpression of a *UAS-E(spl)-m8* transgene, which encodes one of the bHLH repressors activated by the canonical N signaling pathway (DE CELIS *et al.* 1996; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.* 1999, for review),

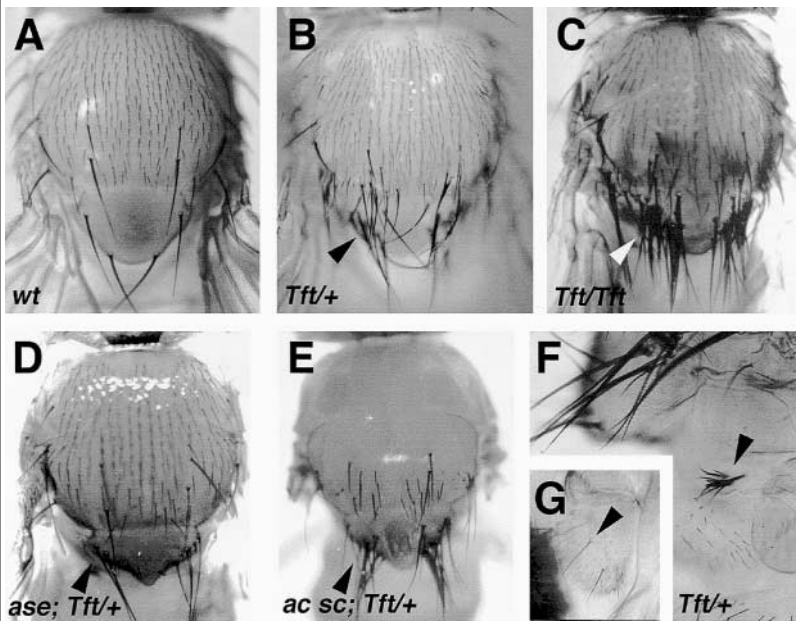


FIGURE 1.—Bristle phenotypes of *Tft* mutants. Nota of wild type (A), *Tft*¹/+ (B), *Tft*¹/*Tft*¹ (C), *ase*¹/*Tft*¹/+ (D), and *In(1)sc*^{10.1}; *Tft*¹/+ (E) flies are shown. The *In(1)sc*^{10.1} allele lacks *ac* and *sc*, but not *ase*, expression. The clusters of ectopic bristles are largest in *Tft*¹ homozygous individuals (arrowheads), disappear in *ase*¹ mutants, and are independent of *ac-sc*. Ectopic bristles in the metanotum (F) and in the antenna (G) of a *Tft*¹/+ fly (arrowheads) are shown.

strongly suppressed the *Tft*¹ phenotype (Table 1). This again indicated that the *Tft* bristles are sensitive to lateral inhibition. On the other hand, the *Tft*¹ mutant phenotype was also strongly modified in combinations with *emc* alleles, as a hypomorphic condition (*emc*¹/*emc*^{ped}) substantially increased the number of extra bristles, and the gain-of-function allele *Achaetus* (*emc*^{Ach}) almost completely suppressed the ectopic bristles. Since *emc* directly antagonizes proneural gene function (ELLIS *et al.* 1990; GARRELL and MODOLELL 1990), it appears that the proneural capability of some regions of the thorax is greatly increased in *Tft*¹/+ or *Tft*¹ homozygous individuals and that the lateral inhibition pathway, albeit operative, is inefficient in preventing excess SOP singling out from these regions.

***amos* is misexpressed in *Tft*¹ mutants:** Since the *Tft*¹ mutation genetically maps to chromosomal position 37A+ (LINDSLEY and ZIMM 1992), very close to the position of the *amos* proneural gene (GOULDING *et al.* 2000; HUANG *et al.* 2000), we examined whether *amos* was expressed in wing and haltere discs carrying the *Tft*¹ allele. This was the case, as *amos* mRNA was detected in the dorsocentral, postalar, and scutellar regions of the presumptive notum and in the postnotum (Figure 2E). Ectopic *amos* mRNA was also found in equivalent regions of the third instar haltere disc (not shown). In contrast, *amos* was not expressed in wild-type wing and haltere discs (GOULDING *et al.* 2000 and our unpublished data). The location of *amos* misexpression correlated well with the position where ectopic bristles develop in the adult (Figure 1, A–C) and where the ectopic SOPs arise in the wing disc (Figure 2H). The expression of the *E(spl)-m8* gene was increased in this region (Figure 2, K and L), consistent with an ability of ectopic Amos, similarly to Ac and Sc in the extant proneural clusters

of this disc (DE CELIS *et al.* 1996; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.* 1999), to stimulate N signaling.

In the wild type, *amos* is also expressed during pupation in the distal part of the leg discs, which correlates with the tarsal claws, and in three semicircular bands of the developing third segment antennal wild-type disc, which allows proper development of the antenna's olfactory sensilla (GOULDING *et al.* 2000). *amos* expression in the antennal disc of *Tft*¹ mutants appeared wild type, consistent with an essentially normal arrangement of olfactory sensilla in *Tft*¹/+ antennae (not shown). However, the presence of an occasional sensory bristle (Figure 1G), similar to bristles that appear when *amos* is overexpressed in the antenna (GOULDING *et al.* 2000), suggested that *amos* might also be mildly overexpressed in this region.

In wild-type embryos, *amos* is expressed during stages 9–12 in a lateral, small group of cells in each of the thoracic and abdominal segments, in addition to a few groups in the cephalic segments (HUANG *et al.* 2000). This pattern is gradually restricted to two or three single cells (Figure 2A) that later will differentiate into dorsal bipolar (dbp) or dorsal multidendritic (dmd) neurons of the dorsal cluster of the peripheral nervous system (PNS; HUANG *et al.* 2000; see also Figure 3A). In contrast, in *Tft*¹/+ embryos, *amos* expression was expanded into a relatively large region of each segment (Figure 2B). This ectopic expression was not refined to a more restricted pattern and it was associated with the generation of extra neurons in the dorsal cluster (compare Figure 3A with 3B). Occasionally, the dorsal bipolar neuron was duplicated (Figure 3D). Staining of these embryos with anti-Cut antibody, which labels SOPs of the external sensory organs, their descendants including an associated md neuron, and some additional md neurons

(BREWSTER and BODMER 1995), showed a small increase in the number of Cut-positive cells in the dorsal cluster (not shown).

Ectopic *amos* expression is removed in *Tft*¹ revertants: Revertants of *Tft*¹ devoid of extra bristles on the notum were obtained by X-ray mutagenesis. *Tft*^{RM9} was homozygous viable and was associated with an inversion with a breakpoint in the vicinity of chromosomal subdivision

37A (M. ASHBURNER, personal communication). The absence of notum ectopic bristles correlated with the absence of *amos* expression in third instar wing discs (Figure 2G). The embryonic expression during stages 9–12 reverted to that of the wild type (Figure 2C) and the pattern of neurons in the embryonic PNS was essentially normal (not shown). Another revertant, *Tft*^{RM11}, was homozygous lethal. No ectopic expression of *amos* was detected in *Tft*^{RM11}/+ third instar wing discs (not shown). In embryos homozygous for *Tft*^{RM11}, *amos* expression was strongly reduced, as compared to that in the wild type (Figure 2D), the *Tft*¹ ectopic neurons were eliminated, and the dorsal cluster had significantly fewer neurons than in the wild type. According to the morphology of the remaining neurons, the reduction appeared to affect dmd neurons (Figure 3C) and, clearly, the dorsal bipolar neuron (Figure 3F). This phenotype is similar to that described for RNAi experiments directed to remove *amos* function (HUANG *et al.* 2000) and suggests that *Tft*^{RM11} is a hypomorphic allele of *amos*. This was verified by complementation tests using the deficiency *Df(2)M36F-S6*, which eliminates *amos*, and is homozygous lethal (HUANG *et al.* 2000). We found that *Tft*^{RM11}, which poorly expresses *amos*, did not complement *Df(2)M36F-S6*, but *Tft*^{RM9}, which expresses *amos* at approximately wild-type levels, did complement it (not shown). In summary, the above data indicate that the *Tft* phenotype is caused by the ectopic expression of *amos* and that removal of this expression is sufficient to revert the phenotype. Overexpression experiments with an *amos* transgene reinforced this conclusion (see below).

***amos* misexpression produces extra SOs:** It is known

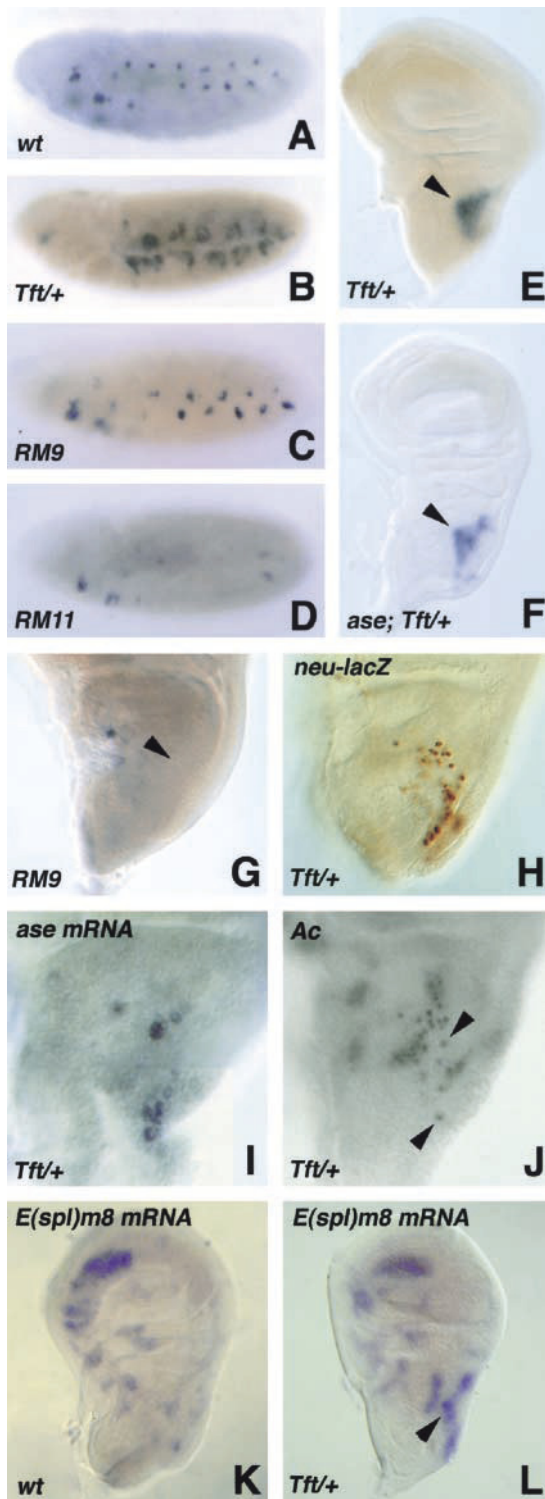


FIGURE 2.—Expression of *amos* and of other genes in embryos and wing imaginal discs bearing *Tft* alleles. Wild type (A), *Tft*¹/+ (B), *Tft*^{RM9} (C), and *Tft*^{RM11} (D) stage 11–12 embryos hybridized with an *amos* probe are shown. Note the expanded domains of *amos* expression in the germ band of *Tft*¹/+ embryos and their nearly complete disappearance in the *Tft*^{RM11} revertants. *amos* expression in *Tft*¹/+ (E), *ase*¹;*Tft*¹/+ (F), and *Tft*^{RM9} (G) third instar wing imaginal discs is shown. The ectopic expression of *amos* (arrowheads) does not depend on *ase* (F) and is absent in the revertant (G). Expression of *neu-lacZ* (H), an SOP-specific marker (HUANG *et al.* 1991), in the presumptive notum of *Tft*¹/+ imaginal discs is shown. Note the emergence of a large number of SOPs in the domain of ectopic *amos* expression (compare with E). In a wild-type disc, only a few SOPs appear in this region (CUBAS *et al.* 1991). The *Tft*¹-dependent extra SOPs also express *ase* mRNA (I) and accumulate Ac (J) and Sc (not shown) proteins. Images correspond to homozygous *Tft*¹ wing imaginal discs. In J, the *Tft*-induced SOPs appear as single cells outside the extant proneural clusters (arrowheads point at two of them). (K and L) Wild-type and *Tft*¹/+ discs, respectively, hybridized with an *E(spl)m8* probe. Note the increased expression of *E(spl)m8* in the region of ectopic *amos* expression (arrowhead, compare with E and F), which gives rise to ectopic SOPs (compare with H and J).

TABLE 1

Average number (and standard deviation) of ectopic macrochaetae on heminota of *Tft*¹/+ flies harboring different mutations or overexpressing *UAS-E(spl)m8*

+	23 ± 3
<i>emc</i> ¹ / <i>emc</i> ^{bel}	35 ± 6
<i>emc</i> ^{Ach} / <i>emc</i> ^{Ach}	4 ± 2
<i>h</i> ¹ / <i>h</i> ¹	24 ± 3 ^a
<i>N</i> ^{264.39} /+	26 ± 3
<i>Ax</i> ^{M1} /+	16 ± 4
<i>DI</i> ^{M1} /+	33 ± 5
<i>H</i> ² /+	19 ± 2
<i>UAS-E(spl)m8/C765-Gal4</i>	6 ± 2

A total of 13 to 20 heminota, each from a different fly, were examined.
^a The ectopic extramicrochaetae on the scutellum characteristic of *hairy* alleles are suppressed in *Tft* mutants.

that the misexpression of *amos* produces ectopic sensory organs, the type of which depends on the site and the time of misexpression. Thus, in embryos, *amos* misexpression produces ectopic md neurons and other types of neurons (HUANG *et al.* 2000). In the antenna, it produces extra olfactory sensilla and, occasionally, other types of sensory bristles. And outside the antenna, it can give rise to different types of sensory organs (GOULDING *et al.* 2000).

We compared the *Tft* phenotype with that caused by *amos* misexpression. We used different GAL4 lines to drive *UAS-amos* in the notum of *Drosophila*. These misexpressions induced embryonic or pupal lethality with most of the GAL4 drivers used (*ap-Gal4*, *tsh-Gal4*, *pnr-Gal4*, *MS1096*, and *en-Gal4*). With C765, which drives a fairly ubiquitous expression in all imaginal discs (GÓMEZ-SKARMETA *et al.* 1996), pharate flies were obtained at 17°. Their bodies were covered with many sensory organs of different types (Figure 4, C, F, H, and I). These were mostly macrochaetae on the head (not shown) and on the notum (Figure 4C), so that the latter resembled the notum of a *Tft*¹ fly (Figure 1C). Large numbers of sensilla campaniformia appeared in the proximal wing (Figure 4H) and a mixture of bristles of diverse types and sensilla campaniformia (with occasional sensilla of unclear types) in the rest of the wing (Figure 4I). Thus, *amos* overexpression produced different types of sensory organs depending on the site.

We also compared the proneural capacity of *UAS-amos* with that of *UAS-ase* and *UAS-scute* by using the C765 driver. Under our conditions, *UAS-amos* (Figure 4, C, F, H, and I) was a much stronger inducer of ectopic sensory organs than *UAS-ase* (Figure 4, B, E, and G), and *UAS-ase* was stronger than *UAS-sc* (Figure 4, A and D).

The *Tft* notum bristles require *ase* but not *ac* and *sc*: It has been reported that the *Tft* phenotype is not dependent on the presence of the *ac* and *sc* genes, but it is suppressed

by the further removal of the *ase* gene (A. GARCÍA-BELLIDO, personal communication cited in CAMPUZANO *et al.* 1985). We verified these data (Figure 1, D and E) and examined the expression of these proneural genes in *Tft*¹ wing discs to analyze possible regulatory interactions between them and *amos*. *ac*, *sc*, and *ase* were ectopically expressed in the area where the *Tft*¹ SOPs appear, but their expressions occurred only in single, isolated cells (Figure 2, I and J). Not even in younger discs did expression of these genes in that area occur in a proneural-like cluster (not shown). The isolated cells were most likely SOPs, since these three genes are expressed in singled-out bristle precursor cells due to self-stimulatory loops (CULÍ and MODOLELL 1998). The pattern of expression of *ase* in single cells, as opposed to the homogeneous large domain of ectopic *amos*, suggests that it is the presence of *Amos* that triggers the expression of *ase* and not vice versa. Indeed, the ectopic expression of *amos* was not removed in *Tft*¹/+ discs simultaneously mutant for the null *ase*¹ allele (Figure 2F). Taken together, these results indicate that the ectopic expression of *amos* in a relatively large area of the presumptive notum creates an oversized proneural cluster from which many SOPs emerge. These then express *ac*, *sc*, and *ase*, similarly to the SOPs of other external sensory organs (CUBAS *et al.* 1991; SKEATH and CARROLL 1991; BRAND *et al.* 1993; DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993). Moreover, *amos* needs the panneural function of *ase* to single out SOPs from this proneural cluster. We also found that the expression of *amos* is normal in *ase*¹ embryos and that in *ase*¹ adults the olfactory SOs of the antenna appear unaffected (not shown). This further indicated that the expression of *amos* did not depend on *ase* and that this gene is dispensable for the generation of the olfactory SOs.

***Tft*¹ is associated with a small rearrangement of the *amos* chromosomal region:** Salivary polytene chromosomes from *Tft*¹ larvae appeared essentially normal in the region surrounding the reported cytological position of *amos* (36F2–6/37A1–2, not shown). However, by using a probe that contained the *amos* structural gene and ~11 kb of the flanking 5' DNA, we observed two hybridization sites, close to each other, in *Tft*¹ chromosomes (Figure 5A). In contrast, wild-type chromosomes showed a single signal in this region (Figure 5B). Hybridization to *Tft*¹/+ chromosomes (Figure 5C) showed that the distal signal, located in subdivision 36F (a region that is frequently puffed) was shared by the wild-type and *Tft*¹ chromosomes. The proximal signal, specific of the *Tft*¹ chromosome, was located in subdivision 37AB. Similar images of heterozygous *Tft*¹/+ chromosomes were obtained with a probe that contained *amos* and 15 kb of DNA downstream of it (not shown). The simplest explanation of these data is that a duplication of at least several kilobases, which includes the *amos* gene, has occurred in the *Tft*¹ chromosome. Consistent with this interpretation, genomic Southern blots hybridized with an *amos*-specific probe (consisting of the *amos* structural sequences) showed stronger signals

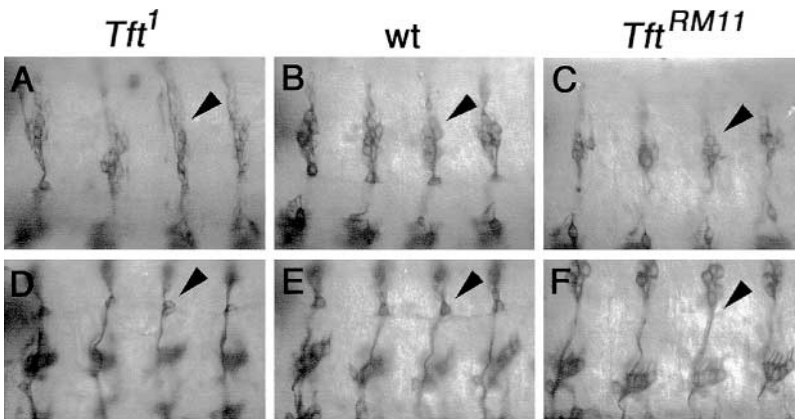


FIGURE 3.—Neuronal defects in the PNS of *Tft* mutants. Stage 15–16 embryos were stained with 22C10 antibody. (A–C) Dorsal neuronal cluster of *Tft*¹, wild-type, and *Tft*^{RM11} embryos, respectively, oriented anterior to the left and dorsal to the top. Arrowheads point to the cluster of the fourth abdominal segment. Note the increase in the number of neurons in the *Tft*¹ dorsal cluster and its decrease in the *Tft*^{RM11} embryo, as compared to the wild type. (D–F) Focus on the position of the dorsal bipolar neuron of *Tft*¹, wild-type, and *Tft*^{RM11} embryos, respectively. This is duplicated in a segment of a *Tft*¹ embryo and is absent in most segments of *Tft*^{RM11} embryos (arrowheads).

in *Tft*¹ DNA than in the control wild-type DNA (not shown).

DISCUSSION

***Tft*¹ is a gain-of-function allele of *amos*:** The *Tft*¹ mutation was isolated by Ritterhouse in 1952 (LINDSLEY and ZIMM 1992). Since then, several studies have aimed at genetically characterizing the nature of this mutation (ARNHEIM 1967; TOKUNAGA 1967; SUR *et al.* 1995). WRIGHT *et al.* (1976) induced deficiencies in a *Tft*¹ chromosome and obtained reversions of the *Tft*¹ phenotype, which suggested that the *Tft*¹ mutation corresponded to a gain-of-function allele. GHYSEN and RICHELLE (1979) integrated the *Tft*¹ mutation in their chaetogen model and proposed that some of the regulatory circuitry that controls bristle development would be bypassed in these mutants. They also observed that the *Tft*¹ bristles were completely normal, including the presence of underlying neurons that made functional contacts with the CNS. Our data indicate that, indeed, *Tft*¹ corresponds to a gain-of-function allele of the proneural gene *amos*, which is misexpressed in specific regions of the embryo and the larva. Thus, we detect expanded domains of *amos* expression in the lateral regions of stage 11–12 embryos and ectopic expression of *amos* in proximal/posterior regions of the third instar wing and haltere imaginal discs. Within these areas of expression, ectopic PNS neurons develop in the embryo and tufts of external sensory organs (macrochaetae in the notum and smaller bristles in the metathorax) appear in the adult. Moreover, we have obtained revertants of the *Tft*¹ mutation and these remove both the extra neurons and sensory organs and the ectopic expression of *amos*. One of these revertants, *Tft*^{RM11}, is in fact a hypomorphic allele of *amos* and should be renamed *amos*^{RM11}. Furthermore, overexpression of a *UAS-amos* transgene in the wing imaginal disc mimics the *Tft*¹ phenotype by producing extensive tufts of macrochaetae. This indicates that, in the *Tft*¹ discs, the sole misexpression of *amos* is sufficient to trigger the development of the ectopic macrochaetae. Finally, we detect the presence of a modification in the

chromosomal region 36F/37AB, the cytological location of *amos* and *Tft*¹. Although the precise nature of this chromosomal aberration has not been determined, the results are compatible with a modification of sequences in the vicinity of the *amos* structural gene, most likely a chromosomal duplication, that places *amos* and/or the duplicated gene under the control of novel *cis*-regulatory sequences.

Interestingly, *Rough eye* (*Roi*) is another gain-of-function allele of *amos* that shows misexpression of this gene in the developing eye (CHANUT *et al.* 2002). This misexpression disrupts the regulation of the eye proneural gene *ato*, which in turn leads to an irregular distribution of R8 cells. In addition, *amos* misexpression induces excess production of the Hedgehog signaling molecule and the irregular recruitment of other photoreceptor cells. Together, these defects lead to the rough eye phenotype.

The *Tft*¹ bristles require *ase* for development: The observation that the *Tft*¹ phenotype was suppressed by the *Df(1)260-1*, which removes the whole AS-C (and additional genes), but not by the *Df(1)sc*¹⁹, which removes only the distal part of the AS-C, suggested that within the proximal part of the AS-C or in its neighborhood there was a genetic function necessary for the generation of the *Tft*¹ bristles (A. GARCÍA-BELLIDO, personal communication cited in CAMPUZANO *et al.* 1985). We have verified the nondependence of the *Tft*¹ phenotype on the *ac* and *sc* proneural genes by showing that the *In(1)sc*^{10.1}, null for both of these genes (LINDSLEY and ZIMM 1992), does not eliminate the *Tft*¹ bristles. In addition, we have identified the genetic function necessary for generating these bristles as the proneural gene *ase*. Indeed, the *ase*¹ mutation [*Df(1)sc*²] removes 17–18 kb of AS-C DNA (CAMPUZANO *et al.* 1985) and *ase* is the only gene found within this interval (CAMPUZANO *et al.* 1985; ALONSO and CABRERA 1988; GONZÁLEZ *et al.* 1989). *Df(1)ase*¹ almost completely suppresses the *Tft*¹ phenotype. *ase* has been categorized as both a proneural and a panneural gene (BRAND *et al.* 1993; DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993). It is expressed in all SOPs of the external sensory organs, but it is dispens-

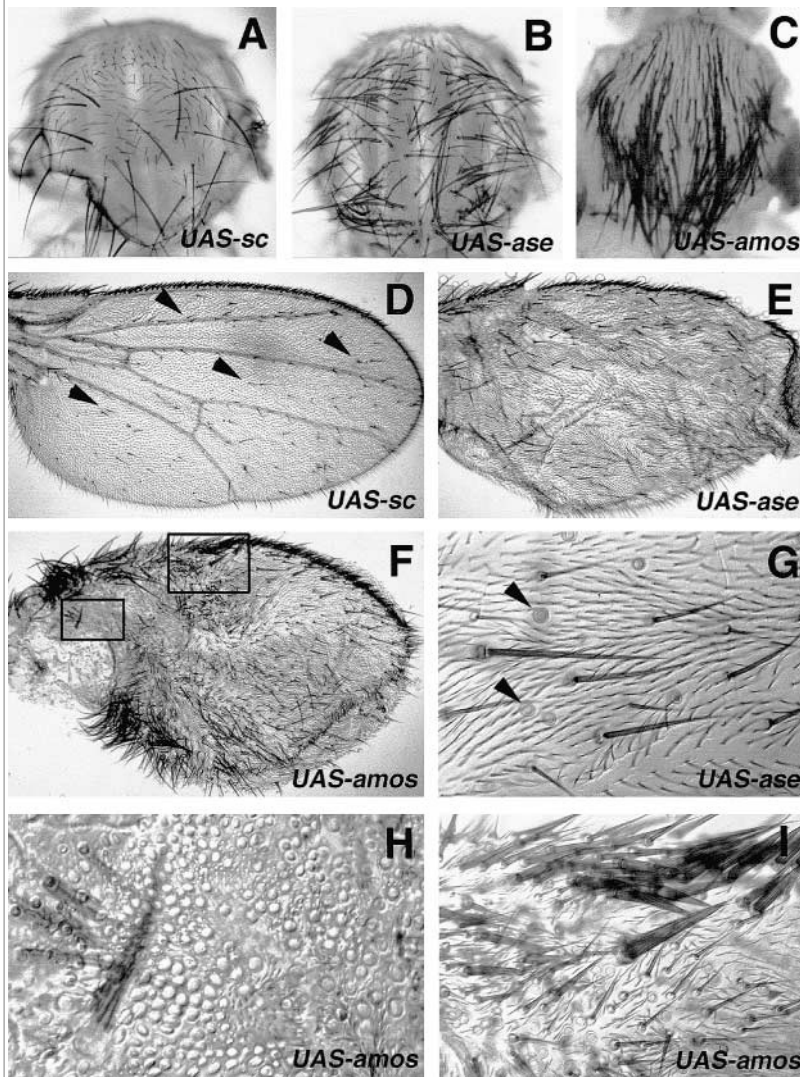


FIGURE 4.—Phenotypes of expression of *UAS-sc*, *UAS-ase*, or *UAS-amos* in wing disc derivatives. Transgenes were driven by C765-Gal4, which promotes ubiquitous expression in the wing disc (GÓMEZ-SKARMETA *et al.* 1996). (A and D) Expression of *UAS-sc* at 25° promotes few extra bristles on the notum (compare with wild-type notum in Figure 3A) and wing (arrowheads point at some ectopic bristles). (B and E) Expression of *UAS-ase* at 25° promotes generation of many more ectopic bristles. (C and F) Expression of *UAS-amos* at 17° gives rise to even more ectopic sensory organs. Only pharate individuals could be recovered. (G) Detail of a wing expressing *UAS-ase* shown at higher magnification reveals numerous ectopic bristles and sensilla campaniformia (arrowheads). (H and I) Details of selected regions of F (squares) at higher magnification. Note the large number of sensilla campaniformia that develop in the proximal part of the wing (H). In more distal parts (I), bristles of different types are more abundant than sensilla campaniformia. As in *Tft¹* flies, extra bristles arise in contiguous positions.

able for many of them, like most if not all of the notum macrochaetae. Since in flies lacking *ase* the olfactory sensilla develop normally (E. VILLA-CUESTA, unpublished data), it is clear that *amos* does not always require *ase* to generate sensory organs. It has been suggested that *ase* might be required to reinforce the proneural potential of other genes in places where sensory organs arise close to each other, as at the anterior wing margin, where *ase* complements *ac* and *sc* (DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993). This increased proneural function might be necessary to overcome strong lateral inhibition mediated by the Notch pathway. However, if this were the reason for the *ase* requirement for the *Tft¹* bristles, one would expect that the removal of *ase* would lead to a decrease in the density of bristles, rather than to their almost complete elimination. Possibly the levels of *amos* expression at the *Tft¹* wing disc are insufficient to provide enough proneural function for notum macrochaetae development, or alternatively these sensory organs have a strict requirement for a proneural gene of the AS-C type to develop. Carefully controlled misexpres-

sions of *amos* in an AS-C⁻ background may help resolve this alternative.

Relative proneural capacity of *amos*, *ase*, and *sc*: We have compared the capacity of *UAS-amos*, *UAS-ase*, and *UAS-sc* to generate external sensory organs in the wing disc derivatives. By using the C765 driver, which promotes ubiquitous but not overly strong expression in this disc (GÓMEZ-SKARMETA *et al.* 1996), we managed to recover adult flies. On the notum and wings, the three transgenes induced development of essentially the same types of sensory organs, namely, mostly macrochaetae on the notum, similarly to the *Tft¹* phenotype, and chaetae and sensilla campaniformia on the wing (Figure 4). However, *UAS-amos* was much more effective than *UAS-ase*, and *UAS-ase* was more effective than *UAS-sc*. In contrast, others have reported that *UAS-sc* was more effective than *UAS-amos* in inducing bristle development on the wing blade (HUANG *et al.* 2000). In that study, ectopic expressions were limited to a time interval after puparium formation and the absolute number of ectopic sensory organs recovered with *UAS-amos* was

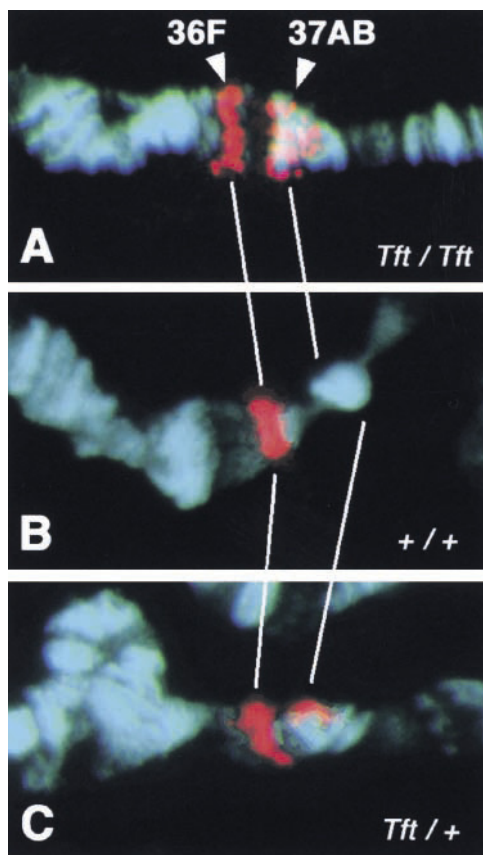


FIGURE 5.—Hybridization *in situ* of *amos* genomic DNA to *Tft¹/Tft¹* (A), wild-type (B), and *Tft¹/+* (C) salivary gland chromosomes. The focus is on the chromosomal 36F/37AB region. Distal is to the left. Red shows hybridization signals on the DAPI-stained chromosomes (light blue). See explanation in text.

much smaller than that recovered under our experimental conditions. Since the number of sensory organs generated depends on the levels of proneural gene expression and the developmental stage (RODRÍGUEZ *et al.* 1990), this discrepancy is not surprising. Evidently, we cannot rule out that part of the high efficiency of our *UAS-amos* transgene might be due to it being very strongly expressed. A conclusive demonstration of the proneural potential of the different proneural proteins will require a precise determination of their levels of accumulation.

Still, in the wild type, *amos* is able to generate large groups of contiguous sensory organs, namely, the antennal olfactory sensilla. The *Tft¹* mutant, as well as our experimental conditions of *UAS-amos* expression, reproduces this ability and generates large numbers of contiguous sensory organs, although these are either macrochaetae on the notum or sensilla campaniformia at the proximal part of the wing (Figure 4). Hence, this ability does not seem restricted to a specific tissue (the antenna), but seems more dependent on the particular proneural gene being expressed and on the levels of its expression. Note that strong and generalized overex-

pressions of *ac* or *ac* plus *sc* in some *Hairy-wing* mutants (*Hw¹* and *Hw^{49c}*) do not give rise to contiguous bristles (CAMPUZANO *et al.* 1986; BALCELLS *et al.* 1988; LINDSLEY and ZIMM 1992), as *amos* does in *Tft¹* mutants. Conceivably, *amos* might be able to generate closely spaced bristles by being relatively inefficient at inducing Notch-mediated lateral inhibition. However, mutations in members of the N signaling pathway that decrease or increase signaling tend, respectively, to potentiate or suppress the *Tft¹* phenotype, indicating that lateral inhibition is still functional among the cells expressing *amos* ectopically. Moreover, the expression of *E(spl)-m8*, an effector of the N pathway, is enhanced in the region where *amos* is ectopically expressed, indicating the activity of the pathway. Hence, we suggest that *amos* can give rise to closely spaced sensory organs due to a strong proneural potential. Consistently, we find that the *Tft¹* phenotype is very sensitive to an excess of function of *emc*, a direct antagonist of the proneural function (ELLIS *et al.* 1990; GARRELL and MODOLELL 1990). Furthermore, *amos* does not require *ase* to generate the large number of packed olfactory sensilla on the antenna. In contrast, *ac* and *sc*, with presumably weaker proneural activities, do require *ase* to give rise to the densely packed bristles of the anterior wing margin (DOMÍNGUEZ and CAMPUZANO 1993).

Neuronal specificity of *amos*: It has also been reported that *UAS-amos* is able to generate, on the notum and wing, sensilla morphologically similar to the olfactory ones of the antenna (GOULDING *et al.* 2000). Under our experimental conditions, most sensilla generated by *UAS-amos* were similar to those typical of each region, that is, macrochaetae on the notum, thin and stout bristles near the anterior wing margin, sensilla campaniformia similar to those of vein L3 on the wing blade, etc. On the wing blade were also many small bristles, some of which might have a resemblance to olfactory sensilla. The dorsal cluster of *Tft¹* embryos showed a slight increase in the number of Cut-positive cells, some of which could correspond to extra external sensory organs and their associated dmd neurons, and a larger increase in the total number of neurons, which suggests that the ectopic *amos* induced development of more than one kind of neuron. Similarly, HUANG *et al.* (2000) showed that *UAS-amos* promoted differentiation of md neurons in the ventral cluster, chordotonal neurons in the lateral region, and an unspecified type of neuron in the dorsal cluster. However, we cannot conclude that *amos*, by itself, can induce many kinds of sensory organs/neurons. Upon emergence, *amos*-induced SOPs may activate other proneural genes like *ac*, *sc*, and *ase*. This is indeed the case for the *Tft* notum macrochaetae, and we have found that *ase* is essential for their development. Thus, examination of the sensory organs that arise upon expression of each individual proneural gene in the absence of all the others will be necessary to unveil their

contribution to the identity of sensory organs (see BRAY 2000 for further discussion on this topic).

We are grateful to S. Campuzano, J. L. Gómez-Skarmeta, and colleagues of our laboratory for suggestions and constructive criticism of the manuscript; to A. García-Bellido, J. Moscoso del Prado, and T. R. Wright for advice; to M. Ashburner for cytological examination of Tft revertants; and to A. Jarman for providing reagents and stocks. Predoctoral fellowships from Ministerio de Ciencia y Tecnología to E.V.-C. and from Comunidad Autónoma de Madrid to J.d.N. and R.D.d.C. are acknowledged. Grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PB90-0085 and PB98-0682) and an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa are acknowledged.

LITERATURE CITED

- ALONSO, M. C., and C. V. CABRERA, 1988 The *achaete-scute* gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO J.* **7**: 2585–2591.
- ARNHEIM, N., 1967 The regional effects of two mutants in *Drosophila* analyzed by means of mosaics. *Genetics* **56**: 253–263.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., M. D. RAND and R. J. LAKE, 1999 Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770–776.
- ASHBURNER, M., 1989 *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- BALCELLS, L., J. MODOLELL and M. RUIZ-GÓMEZ, 1988 A unitary basis for different *Hairy-wing* mutations of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **7**: 3899–3906.
- BOTAS, J., J. MOSCOSO DEL PRADO and A. GARCÍA-BELLIDO, 1982 Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in *Drosophila*. *EMBO J.* **1**: 307–310.
- BRAND, A. H., and E. L. DORMAND, 1995 The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 572–578.
- BRAND, M., A. P. JARMAN, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1993 *asense* is a *Drosophila* neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* **119**: 1–17.
- BRAY, S., 2000 Specificity and promiscuity among proneural proteins. *Neuron* **25**: 1–2.
- BREWSTER, R., and R. BODMER, 1995 Origin and specification of type II sensory neurons in *Drosophila*. *Development* **121**: 2923–2936.
- CAMPUZANO, S., and J. MODOLELL, 1992 Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends Genet.* **8**: 202–207.
- CAMPUZANO, S., L. CARRAMOLINO, C. V. CABRERA, M. RUIZ-GÓMEZ, R. VILLARES *et al.*, 1985 Molecular genetics of the *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* **40**: 327–338.
- CAMPUZANO, S., L. BALCELLS, R. VILLARES, L. CARRAMOLINO, L. GARCÍA-ALONSO *et al.*, 1986 Excess function *Hairy-wing* mutations caused by *gypsy* and *copia* insertions within structural genes of the *achaete-scute* locus of *Drosophila*. *Cell* **44**: 303–312.
- CAUDY, M., H. VASSIN, M. BRAND, R. TUMA, L. Y. JAN *et al.*, 1988 *daughterless*, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the *achaete-scute* complex. *Cell* **55**: 1061–1067.
- CHANUT, F., K. WOO, S. PEREIRA, T. J. DONOHUE, S. Y. CHANG *et al.*, 2002 *Rough eye* is a gain-of-function allele of *amos* that disrupts regulation of the proneural gene *atonal* during *Drosophila* retinal differentiation. *Genetics* **160**: 623–635.
- CUBAS, P., J. F. DE CELIS, S. CAMPUZANO and J. MODOLELL, 1991 Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**: 996–1008.
- CULÍ, J., and J. MODOLELL, 1998 Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by *Notch* signaling. *Genes Dev.* **12**: 2036–2047.
- DAMBLY-CHAUDIÈRE, C., and A. GHYSEN, 1987 Independent subpatterns of sense organs require independent genes of the *achaete-scute* complex in *Drosophila* larvae. *Genes Dev.* **1**: 297–306.
- DAMBLY-CHAUDIÈRE, C., A. GHYSEN, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1988 The determination of sense organs in *Drosophila*: interaction of *scute* with *daughterless*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **197**: 419–423.
- DE CELIS, J. F., J. DE CELIS, P. LIGOXYGAKIS, A. PREISS, C. DELIDAKIS *et al.*, 1996 Functional relationships between *Notch*, *Su(H)* and the bHLH genes of the *E(spl)* complex: the *E(spl)* genes mediate only a subset of *Notch* activities during imaginal development. *Development* **122**: 2719–2728.
- DOMÍNGUEZ, M., and S. CAMPUZANO, 1993 *asense*, a member of the *Drosophila achaete-scute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J.* **12**: 2049–2060.
- ELLIS, H. M., D. R. SPANN and J. W. POSAKONY, 1990 *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* **61**: 27–38.
- ENGELS, W. R., C. R. PRESTON, P. THOMPSON and W. B. EGGLESTON, 1986 *In situ* hybridization to *Drosophila* salivary chromosomes with biotinylated DNA probes and alkaline phosphatase. *Focus* **8** (1): 6–8.
- FUJITA, S. C., S. L. ZIPURSKI, S. BENZER, A. FERRÚS and S. L. SHOTWELL, 1982 Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7929–7933.
- GARCÍA-BELLIDO, A., 1979 Genetic analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **91**: 491–520.
- GARCÍA-BELLIDO, A., and J. R. MERRIAM, 1971 Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2222–2226.
- GARRELL, J., and J. MODOLELL, 1990 The *Drosophila extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* **61**: 39–48.
- GHYSEN, A., and J. RICHELLE, 1979 Determination of sensory bristles and pattern formation in *Drosophila*. II. The *achaete-scute* locus. *Dev. Biol.* **70**: 438–452.
- GHYSEN, A., C. DAMBLY-CHAUDIÈRE, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1993 Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev.* **7**: 723–733.
- GÓMEZ-SKARMETA, J. L., R. DIEZ DEL CORRAL, E. DE LA CALLE-MUSTIENES, D. FERRÉS-MARCÓ and J. MODOLELL, 1996 *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* **85**: 95–105.
- GONZÁLEZ, F., S. ROMANI, P. CUBAS, J. MODOLELL and S. CAMPUZANO, 1989 Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* **8**: 3553–3562.
- GONZÁLEZ-CRESPO, S., and M. LEVINE, 1993 Interactions between *dorsal* and helix-loop-helix proteins initiate the differentiation of the embryonic mesoderm and neuroectoderm in *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**: 1703–1713.
- GOULDING, S. E., P. ZUR LAGE and A. P. JARMAN, 2000 *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron* **25**: 69–78.
- HUANG, F., C. DAMBLY-CHAUDIÈRE and A. GHYSEN, 1991 The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**: 1087–1095.
- HUANG, M. L., C. H. HSU and C. T. CHIEN, 2000 The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* **25**: 57–67.
- JAN, Y. N., and L. Y. JAN, 1993 HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* **75**: 827–830.
- JARMAN, A. P., M. BRAND, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1993 The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* **119**: 19–29.
- JARMAN, A. P., Y. GRAU, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1993 *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* **73**: 1307–1321.
- JARMAN, A. P., E. H. GRELL, L. ACKERMAN, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1994 *atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**: 398–400.
- JIMÉNEZ, F., and J. A. CAMPOS-ORTEGA, 1979 On a region of the *Drosophila* genome necessary for central nervous system development. *Nature* **282**: 310–312.
- LAI, E. C., 2003 *Drosophila Tufted* is a gain-of-function allele of the proneural gene *amos*. *Genetics* **163**: 1413–1425.
- LINDSLEY, D. L., and G. G. ZIMM, 1992 *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

1412

E. Villa-Cuesta *et al.*

- MARÍ-BEFA, M., J. F. DE CELIS and A. GARCÍA-BELLIDO, 1991 Genetic and developmental analyses of chaetae pattern formation in *Drosophila* tergites. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **200**: 132–142.
- MARTÍN-BERMUDO, M. D., C. MARTÍNEZ and F. JIMÉNEZ, 1991 Distribution and function of the *lethal of scute* gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **113**: 445–454.
- MURRE, C., P. S. McCAW and D. BALTIMORE, 1989 A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**: 777–783.
- PARRAS, C., L. A. GARCÍA-ALONSO, I. RODRÍGUEZ and F. JIMÉNEZ, 1996 Control of neural precursor specification by proneural proteins in the CNS of *Drosophila*. *EMBO J.* **15**: 6394–6399.
- RODRÍGUEZ, I., R. HERNÁNDEZ, J. MODOLELL and M. RUIZ-GÓMEZ, 1990 Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *EMBO J.* **9**: 3583–3592.
- RUIZ-GÓMEZ, M., and A. GHYSEN, 1993 The expression and role of a proneural gene, *achaete*, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **12**: 1121–1130.
- SKEATH, J. B., and S. B. CARROLL, 1991 Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **5**: 984–995.
- SUR, R., S. BASU, S. GHOSH and A. S. MUKHERJEE, 1995 Epigenetic interaction between *Scutoid* (*Sco*) and *Tufted* (*Tft*) of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.* **76**: 152–153.
- TOKUNAGA, C., 1967 Linkage data. Recombination frequency between *Tufted* and *Bristle*. *Dros. Inf. Serv.* **42**: 40.
- WRIGHT, T. R. F., R. B. HODGETTS and A. F. SHERALD, 1976 The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**: 267–285.

Communicating editor: T. C. KAUFMAN

Development 134, 1779–1788 (2007) doi:10.1242/dev.02844

tailup, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in *Drosophila* dorsal mesothorax specification

Joaquín de Navascués and Juan Modolell*

The LIM-HD gene *tailup* (*tup*; also known as *islet*) has been categorised as a prepattern gene that antagonises the formation of sensory bristles on the notum of *Drosophila* by downregulating the expression of the proneural *achaete-scute* genes. Here we show that *tup* has an earlier function in the development of the imaginal wing disc; namely, the specification of the notum territory. Absence of *tup* function causes cells of this anlage to upregulate different wing-hinge genes and to lose expression of some notum genes. Consistently, these cells differentiate hinge structures or modified notum cuticle. The LIM-HD co-factors Chip and Ssdp are also necessary for notum specification. This suggests that Tup acts in this process in a complex with Chip and Ssdp. Overexpression of *tup*, together with *araucan*, a 'pronotum' gene of the iroquois complex (Iro-C), synergistically reinforces the weak capacity of either gene, when overexpressed singly, to induce ectopic notum-like development. Whereas the Iro-C genes are activated in the notum anlage by EGFR signalling, *tup* is positively regulated by Dpp signalling. Our data support a model in which the EGFR and Dpp signalling pathways, with their respective downstream Iro-C and *tup* genes, converge and cooperate to commit cells to the notum developmental fate.

KEY WORDS: *tailup*, *islet*, Notum development, EGFR, Dpp, *Drosophila*

INTRODUCTION

The imaginal wing discs of *Drosophila*, the precursors of the wings and most of the mesothorax, are a classical system in which to study the allocation of different subsets of cells to diverse developmental fates, i.e. body wall (dorsal mesothorax) or appendage (wing). Although we still lack a comprehensive picture of the genetic processes governing the development of the wing disc, genes and signalling pathways have been identified that define the proximal-most part of the disc as the notum territory (reviewed by Calleja et al., 2002; Mann and Morata, 2000). The EGFR signalling pathway plays a major role, as its absence prevents formation of the notum (Simcox et al., 1996; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002b). In the notum anlage, EGFR signalling activates the genes of the iroquois complex (Iro-C), a cluster of three related homeodomain genes, *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) and *mirror* (*mirr*), that are conserved from worms to vertebrates (reviewed by Cavodeassi et al., 2001; Gómez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997). Since the inactivity of Iro-C changes the developmental fate of cells within the presumptive notum territory towards wing hinge (Diez del Corral et al., 1999), the Iro-C genes are considered to have a 'pronotum' function and their domain of expression in the second instar disc defines the extent of the notum territory. However, the overexpression of Iro-C genes imposes a notum differentiation fate on wing cells only under a limited set of conditions (Aldaz et al., 2003; Wang et al., 2000). This suggests that genes other than Iro-C help to specify notum identity.

Dpp signalling is also important for notum development. In the second instar disc, it defines the distal limit of the notum by repressing Iro-C in the hinge territory (Cavodeassi et al., 2002). Later, Dpp signalling effects a medial (proximal) versus lateral subdivision of the notum. This involves activation of the GATA

factor Pannier (Pnr) and the Friend of GATA factor U-shaped (Ush) (Cubadda et al., 1997; Romain et al., 1993) in the medial notum territory (Sato and Saigo, 2000; Tomoyasu et al., 2000). Pnr, probably together with Ush (Haenlin et al., 1997), represses Iro-C in this region and permits its specification as medial notum (Calleja et al., 2000). An anterior/posterior subdivision is carried out by *eyegone* (*eyg*), a Pax-homeobox gene that is activated by Iro-C and Pnr and whose expression is confined to the anterior notum by the Dpp and Hedgehog pathways (Aldaz et al., 2003). In the absence of *eyg*, this territory does not develop. Forced coexpression of *eyg* and *ara* imposes an anterior notum developmental fate on posterior or lateral notum cells and even on wing cells (Aldaz et al., 2003).

tup encodes a LIM-homeodomain transcription factor that is implicated in axon pathfinding and neurotransmitter identity (Thor and Thomas, 1997). A vertebrate homologue of Tup, Isl1, is required for the proper development of the pancreas and heart, and the specification of several cell types, among them the pancreas islet cells and some motoneurons and interneurons (reviewed by Hobert and Westphal, 2000; Hunter and Rhodes, 2005). LIM-HD factors are capable of multiple protein-protein interactions (reviewed by Bach, 2000; Hobert and Westphal, 2000). In many contexts, a central co-factor is Chip (also known as NLI and Ldb), which homodimerises and assembles a 2LIM-HD–2Chip–2Ssdp hexamer (reviewed by Matthews and Visvader, 2003). The LIM-HD factor allows the complex to interact with DNA through its homeodomain, and transcriptional activation seems to be mediated by the Ssdp proteins (Nishioka et al., 2005). The organisation and regulatory properties of this hexamer have been mostly characterised for the LIM-HD Apterous (Ap) in the *Drosophila* wing (Chen et al., 2002; Fernández-Fúnez et al., 1998; Milán and Cohen, 1999; Rincón-Limas et al., 2000; van Meyel et al., 2003). In the third instar wing disc, *tup* is expressed in a posterior/central region of the notum territory that overlaps with the dorsocentral (DC) and scutellar proneural clusters of the *achaete-scute* genes (Biryukova and Heitzler, 2005; Cubas et al., 1991; Skeath and Carroll, 1991). Recent work (Biryukova and Heitzler, 2005) has shown that loss of function of *tup* promotes the formation of extra

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC and UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

*Author for correspondence (e-mail: jmodol@cbm.uam.es)

Accepted 26 February 2007

scutellar and DC macrochaetae, whereas overexpression of *tup* suppresses bristle development. *Tup* can physically interact with *Pnr* and with *Chip* (Biryukova and Heitzler, 2005; van Meyel et al., 1999), both positive regulators of *achaete-scute* expression in the DC proneural cluster (García-García et al., 1999; Romain et al., 2000). Accordingly, *tup* has been considered a member of the prepattern genes that control *achaete-scute* expression (Biryukova and Heitzler, 2005). Here we show that, similarly to *Iro-C*, *tup* has an earlier 'pronotum' function that is essential to commit cells to notum development. For this function, *Tup* most likely forms a complex with *Chip* and *SsdP*. *tup* and *Iro-C*, respectively, activated by the *Dpp* and *EGFR* signalling pathways, cooperate in accomplishing this commitment.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks

Most *Drosophila* stocks are described in FlyBase (<http://flybase.org/>). *tup*¹ (*isl*^{IIIIB29}), *tup*² (*isl*^{IIIIE16}) and *tup*^{isl-1} (*isl*^{E41}) were freed of associated lethal mutations, recombined with the FRT40A and characterised at the molecular level. This characterisation agreed with Biryukova and Heitzler (Biryukova and Heitzler, 2005). We obtained (see Parks et al., 2004) a deletion (*tup*^{ex4}) between the FRT-bearing insertions WHf04735 and XPd03613 (Thibault et al., 2004) that removes the entire ORF of *tup* (deletion of the interval 18.856.481-18.877.346 of chromosome 2L, version 4.2 of the annotated *D. melanogaster* genome). *tup*-specific RNAi was produced with a *UAS-tup*^{IR} transgene constructed (Nagel et al., 2002) using an 810 nucleotide fragment of *tup* cDNA AF145674 (interval 96-906). *y, w* embryos were transformed (Rubin and Spradling, 1982) using pUChs π Δ2-3 as a transposase source.

Mosaic analyses

To generate clones of cells mutant for *tup*, *y, w, hs-FLP1.22*; *tup*, *FRT40A/CyO* males were crossed with either *y, w, hs-FLP1.22*; *ubi-GFP*, *FRT40A/CyO* or *y, w, hs-FLP1.22*; *P{y+}25F, ck¹³, FRT40A/CyO* or *f, hs-FLP1.22*; *P{f+}30, ck, FRT40A/CyO* females. Homozygous *tup* clones were induced at different developmental stages by heat treatment at 37°C for either 30 or 60 minutes or by activating a *UAS-FLP* transgene with *pnr*^{MD237}. *Gal4* (Calleja et al., 2000), *MS248-Gal4* (Cavodeassi et al., 2002; Sánchez et al., 1997) or *Ubx-Gal4*^{LDN} (de Navas et al., 2006). Clones null for members of the *EGFR* pathway were prepared by incubating at 37°C for 60 minutes *y, hs-FLP9F, f^{66a}, FRT82B, ubi-GFP, P{f+}87D, M(3)95A/FRT82B, Ras85D^{ΔC40b}* or *y, hs-FLP9F, f^{66a}, FRT82B, ubi-GFP, P{f+}87D, M(3)95A/FRT82B, pnt^{Δ88}* or *y, w, hs-FLP1.22; FRT42D, arm-lacZ, M(2)12/FRT42D, Egfr^{JK35} (Egfr²)* larvae. The *M⁺* genotype (Morata and Ripoll, 1975) of the clones was a requisite for their substantial growth. Clones mutant for *Chip* or *SsdP* were obtained from *y, w, hs-FLP1.22; FRT42D, ubi-GFP/FRT42D, Chir^{5.5}* or *y, hs-FLP9F, f^{66a}, FRT82B, ubi-GFP, P{f+}87D, M(3)95A/FRT82B, SsdP^{neo48}, e* larvae which were treated at 37°C for 75 minutes.

Overexpression analyses

DC-lacZ/CyO; *C765-Gal4* or *dpp^{bik}-Gal4/SM6a-TM6b/DC-lacZ* females (García-García et al., 1999; Gómez-Skarmeta et al., 1996; Staehling-Hampton et al., 1994) were crossed to either *UAS-ara* (Gómez-Skarmeta et al., 1996), *UAS-tup* (Thor and Thomas, 1997), *UAS-tup^{ΔHD}* (O'Keefe et al., 1998), *UAS-ara*; *UAS-tup* or *UAS-ara*; *UAS-tup^{ΔHD}* males, and the progeny raised at 25°C. One or two copies of *UAS-tup^{IR}* were overexpressed with the *MS248-Gal4* driver at 29°C. To overexpress *Mkp3* or *Dad* during notum specification, males homozygous for either the *UAS*-bearing P-GS insertion *Mkp3^{M76}* (Ruiz-Gómez et al., 2005) or the *UAS-Dad* transgene (Tsuneizumi et al., 1997) were crossed with *ptc^{559.1}-Gal4, UAS-GFP/SM6a-TM6b/tub-Gal80^Δ* females (McGuire et al., 2003; Speicher et al., 1994). Progeny were raised at 17°C until mid- or late-second instar, then switched to 29°C for at least 24 hours and dissected. Clones of cells overexpressing diverse *UAS-X* transgenes were generated by incubating at 34°C for 15 minutes *y, w, hs-FLP1.22; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+ UAS-X/+* larvae. Other *UAS*-activated transgenes were: *UAS-Chip* (Milán and Cohen, 1999), *UAS-*

Chip^{ADD} (van Meyel et al., 1999), *UAS-tkv^{QD}* (Das et al., 1998), *UAS-Ras1^{V12}* (Karim and Rubin, 1998), *UAS-Raf^{DN}* (Baek et al., 1996) and *UAS-argos* (Howes et al., 1998).

Antibody staining

Imaginal discs were fixed and stained as described previously (Cubas et al., 1991). Antibodies were: mouse anti-*Tup* (mAb 40.3A4, DSHB), rabbit anti- β -galactosidase (Cappel), rat anti-*Ara/Caup* (Diez del Corral et al., 1999), rabbit anti-*Msh* (McDonald et al., 1998) (provided by C. Doe), rabbit anti-*Tsh* (Ng et al., 1996), rat anti-*Zfh2* (Whitworth and Russell, 2003), rabbit anti-*Ush* (Fossett et al., 2001), guinea pig anti-*Eyg* (Aldaz et al., 2003), mouse anti-*Nub* (Averof and Cohen, 1997), rabbit anti-*Sal* (de Celis et al., 1999). Secondary antibodies and rhodamine phalloidin were obtained from Molecular Probes or Jackson ImmunoResearch.

Image acquisition

Adult unmounted flies were photographed with a Zeiss Axiophot microscope. Images of different focal planes were combined using Photoshop (Adobe). Fluorescence images were captured using a confocal system.

RESULTS

tup is necessary for notum development

Adult *tup* phenotypes were examined in mitotic recombination clones homozygous for the newly generated null deletion allele *tup^{ex4}* and the previously described alleles *tup¹*, *tup²* and *tup^{isl-1}*. We focused on the notum because in third instar wing discs *tup* is exclusively expressed in the notum rudiment (Biryukova and Heitzler, 2005; Butler et al., 2003). A quantitative summary of this phenotypic analysis, comprising over 1600 homozygous *tup^{ex4}* clones, is presented in Table S1 (see Table S1 in the supplementary material). Similar phenotypes were observed with the other *tup* alleles.

Clones were associated with a variety of phenotypes whose nature and frequency depended on the position of the clone (see Fig. S1C in the supplementary material) and on the developmental time of its induction (see Table S1 in the supplementary material). They ranged from partial or complete loss of a heminotum (see Fig. S1A in the supplementary material), to formation on the notum of ectopic wing-hinge structures, malformations of the notum cuticle (Fig. 1) and modifications to the bristle pattern. This latter phenotype will not be described, as effects of *tup* mutations on this pattern have already been reported (Biryukova and Heitzler, 2005). The ectopic hinge structures were tegulae (Fig. 1C) or tegula-like structures (Fig. 1A,B), recognisable sclerites (Fig. 1B) and hinge-like sensilla campaniformia (Fig. 1G,L) or trichoidea (see Fig. S1B in the supplementary material). Seemingly parallel transformations occurred on the metathorax, a derivative of the haltere disc, in which *tup* is also expressed during larval development (data not shown). Sensilla campaniformia similar to those found in the basal part of the haltere were present in the metanotum (Fig. 1D), a region that does not harbour sensilla in the wild type.

Other malformations of the notum cuticle consisted of invaginations (Fig. 1F-I) or protrusions (Fig. 1E). Some invaginations gave rise to vesicles that displayed trichomes and hinge-like sensilla campaniformia (Fig. 1G). At late clone-induction times, a proportion of the vesicles were separated from the notum cuticle, lacked any kind of sensillum, but conserved trichomes (data not shown). Additional morphologically distinct malformations consisted of small, tubercle-like disruptions of the cuticle, with a corrugated appearance and roundish contour (Fig. 1J-L). At their centre, they could have shallow depressions (Fig. 1L) or deep and narrow invaginations (Fig. 1K). The presence of macro- and/or microchaetae indicated that the malformations still developed a

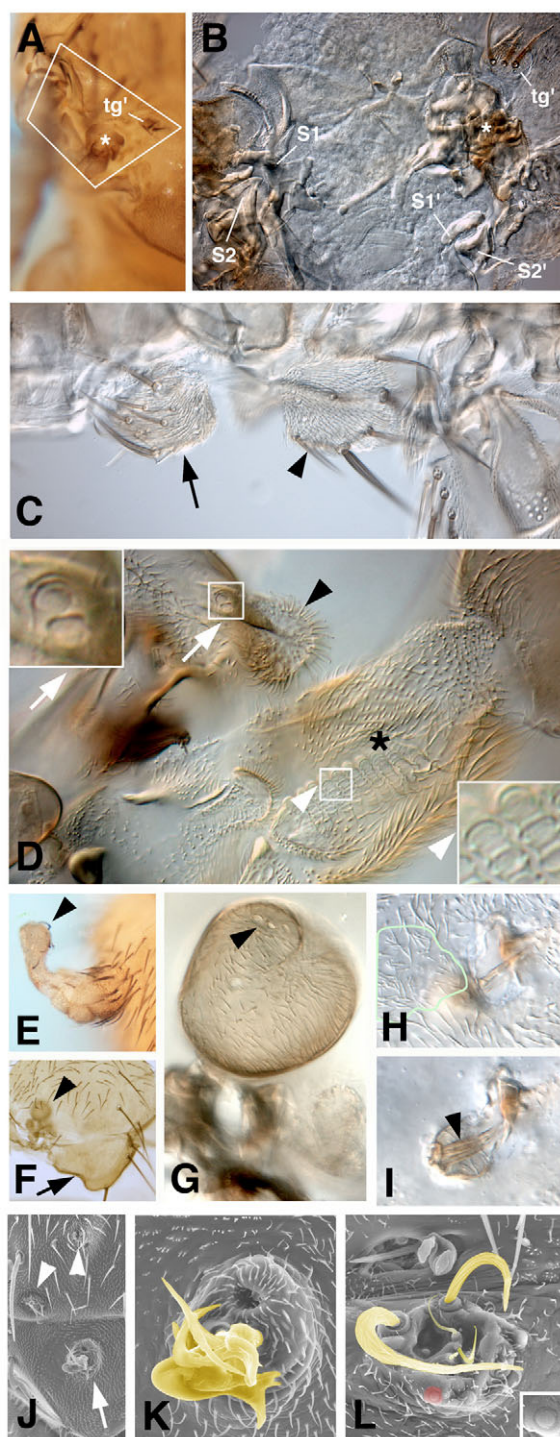


Fig. 1. Cuticular phenotypes associated with *tup* clones. (A) View of the lateral-posterior region of a notum displaying ectopic structures in a fly bearing *f tup²* clones. The framed area is shown at high magnification in B, after mounting of the cuticle. (B) S1 and S2, extant first and second axillary sclerites; S1' and S2', recognisable ectopic sclerites; asterisk and tg', mass of sclerotised tissue and an ectopic tegula-like structure, respectively, bearing macrochaetae and sensilla trichoidea. (C) Ectopic tegula (arrow) with *y tup^{ex4}* bristles, and extant tegula (arrowhead). (D) Pedicel of a haltere (asterisk) showing rows of sensilla campaniformia (white arrowheads). Black arrowhead, ectopic structure on the metanotum bearing at its base pedicel-like sensilla campaniformia (arrows). Insets show boxed regions at high magnification. (E) Protuberance on the anterior lateral notum with *f tup²* microchaetae (arrowhead). (F) Notum showing loss of tissue and of bristles in the scutellum (arrow) and a vesicular invagination (arrowhead). (G) High magnification of the vesicle shown in F. Arrowhead, group of sensilla campaniformia. (H,I) Two focal planes of an invagination with *y tup^{ex4}* microchaetae arising from its interior (arrowhead). Green line, contour of a *crinkled* (*ck*)-marked twin-spot which covers the invagination. (J) Cuticular defects (arrow and arrowheads) on the scutum and scutellum of a fly with *f tup^{isl-1}* clones. (K) Protuberance/invagination (indicated by the arrow in J) at high magnification. Note the apical hole of the invagination, and the abutting *ck* twin-spot tissue in the top-left corner of the panel. (L) Malformation with a central depression and *f tup²* macro and microchaetae. Red, sensillum campaniforme, as shown at higher magnification in the inset. In K and L, some of the mutant *f tup* bristles are coloured yellow.

Expression of *tup* in the wing disc

As early as late first/early second instar, *tup* expression was seen to be confined to the most proximal region of the disc (Fig. 2A,B), which corresponds to at least part of the prospective notum territory. During the second and part of the third instar, *tup* is expressed in all the medial notum territory (this being defined by the *pnr-Gal4* marker) (Calleja et al., 2000) and was seen to extend into the lateral notum (Fig. 2C). In the mid-late third instar, strong expression was maintained in the posterior medial (arrow) and part of the lateral (arrowhead) notum (Fig. 2D). Weak residual activity might be present in the anterior notum (Fig. 2D, asterisk). Comparison with *ara/caup*, which at these stages are expressed in the lateral notum, indicates that the most lateral region of the posterior notum is essentially free of *Tup* (Fig. 2D) (see also Biryukova and Heitzler, 2005; Butler et al., 2003).

tup clones show differential affinity in wing discs

We examined the morphology of *tup* clones in the notum region of third instar wing discs. Clones induced at the first instar were generally large and with a smooth border, which at times was associated with an ectopic fold of the notum epithelium (Fig. 3A). Smaller, later-induced clones, could have either smooth and roundish, or wiggly borders (Fig. 3B). The smooth clones were more prevalent in the posterior notum, which is the region of strong *tup* expression (Fig. 2D). Smooth contours suggest a differential affinity between two cell populations, as these tend to minimise contacts. In addition, many roundish *tup* clones partially extruded themselves towards the subjacent ad epithelial cells (Fig. 3C,D). This behaviour might correlate with the invaginations associated with the adult *tup* mutant epidermis. Still, at these stages, clone cells did not lose their apical connections with the neighbouring wild-type cells, as revealed by the continuous band of apical actin accumulation (Fig. 3D).

notum-like cuticle (Fig. 1E,H,I,K), although occasionally we observed sensilla campaniformia (Fig. 1L) or trichoidea (see Fig. S1 in the supplementary material). The invaginations, projections, tubercles, and attached and detached vesicles probably form a related group of lesions caused by a tendency of *tup* clones to detach from the notum epidermis, an indication of differential cellular adhesive properties. In summary, a proportion of *tup* clones give rise to structures indicative of notum-to-hinge transformations, whereas other clones induce malformations suggestive of modified cell-cell adhesion properties, but maintaining a notum-like identity.

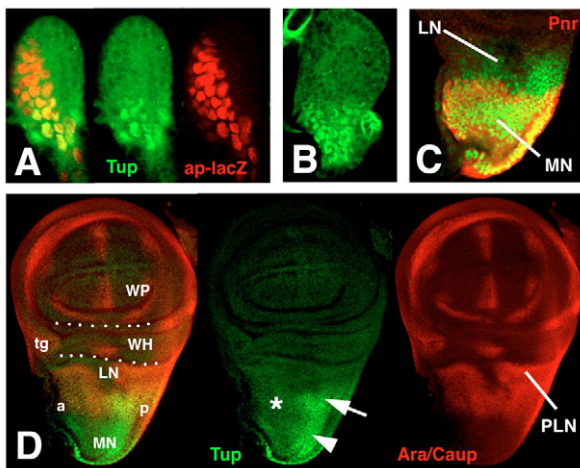


Fig. 2. Expression of *tup* in the imaginal wing disc. (A) Early second instar disc. Green, *Tup*; red, *ap^{rK568}-lacZ*, a marker for the dorsal compartment. (B) Late second instar disc. (C) Notum region of a mid-third instar disc. Red, *pnr-Gal4 UAS-lacZ*. (D) Late third instar disc. Red, *Ara/Caup*. Dotted lines indicate position of the LN/WH and WH/WP borders. Asterisk, region of possible low accumulation of *Tup*. a, anterior; p, posterior; MN, medial notum; LN, lateral notum; PLN, posterior lateral-most notum; WH, wing hinge; WP, wing pouch; tg, tegula.

Notum *tup* clones express hinge markers

Next, we analysed the expression of hinge markers in discs harbouring *tup* clones. *msh* (also known as *Drop* – Flybase), which is expressed strongly at the dorsal hinge and weakly in part of the posterior notum (D'Alessio and Frasch, 1996; Villa-Cuesta and Modolell, 2005) (Fig. 3B", asterisk; Fig. 3G), was always upregulated in first instar-induced clones located at the medial and central notum (Fig. 3F), in some cases even in the neighbouring wild-type tissue (Fig. 3E). However, many clones located at the lateral-most notum failed to upregulate *msh*. In later-induced clones, derepression was generally limited to clones at or near the expression domain of *tup*. Moreover, the levels of expression were different from clone to clone (Fig. 3B,B") and at times even among cells of the same clone (Fig. 3B"). Qualitatively similar observations were made with *zfh2*, which is expressed almost exclusively in the distal hinge (Whitworth and Russell, 2003) (Fig. 6L), *spalt* (*sal*; also known as *salm* – Flybase), which is expressed at high levels in the hinge and lateral notum territories and at a lower level in the posterior notum (de Celis et al., 1999) (Fig. 3I), and the *lacZ* insertion line *l(2)09261*, which is expressed in the hinge and wing pouch territories (Diez del Corral et al., 1999). As examples, we show early-induced clones in which *l(2)09261* and *sal* were respectively upregulated (Fig. 3A,H), and one clone out of several expressing *msh* that also expressed *zfh2* (Fig. 3B,B").

In summary, the requirement of notum cells for *tup* is strongest in the first/second instar and decreases with the age of the disc. This is consistent with the incomplete transformation towards hinge exhibited by many clones in the adult. We should stress that large, early-induced clones (Fig. 3A,F,H), which invariably showed strong derepression of hinge markers, did not survive to adulthood as we never observed territories of *tup* cuticle of the corresponding large size. The infrequent adults that displayed strong defects in the fusion of the heminota or had most of a heminotum missing (see Table S1 in the supplementary material) might have harboured such clones.

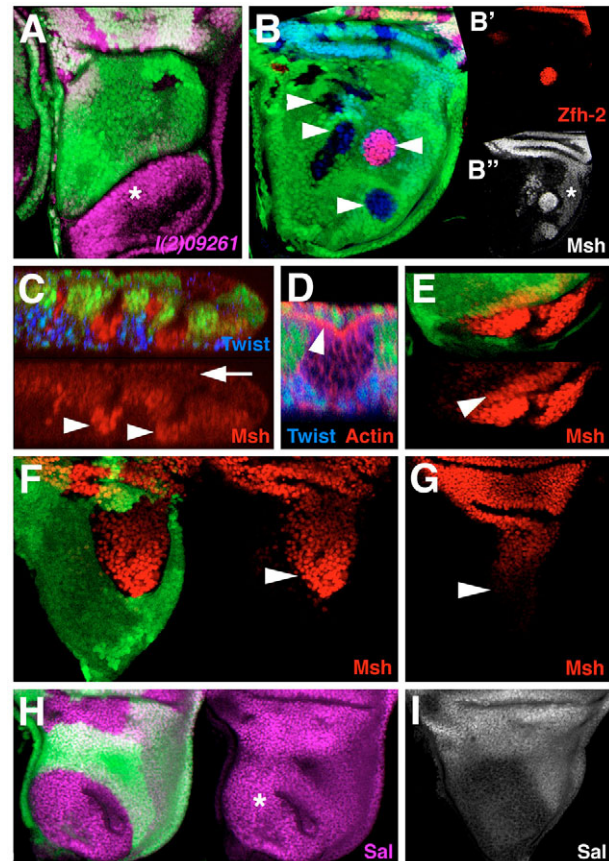


Fig. 3. Expression of wing-hinge markers in *tup* clones located in the notum region. *tup* clones are identified by the absence of GFP (green) expression. (A) First instar-induced *tup^{isl-1}* clone (asterisk). The *lacZ* insertion line *l(2)09261* is derepressed. (B-B") *tup²* clones (arrowheads) derepressing *zfh2* (B') and/or *msh-lacZ* (*msh*, B"). Asterisk, endogenous *msh* expression in the notum. (C) Optical z-axis section through *tup^{ex4}* clones. Red, *msh^{Δ89}-lacZ*; blue, *Twist*, a marker for ad epithelial cells; arrowheads, nuclei of *tup^{ex4}* cells; arrow, peripodial membrane. (D) Extruding *tup^{ex4}* clone stained with phalloidin (red). Arrowhead, apical actin accumulation. (E) *tup²* clone inducing *msh-lacZ* expression autonomously and non-autonomously (arrowhead). (F) First instar-induced *tup^{ex4}* clone with enhanced expression of *msh-lacZ*. Compare (arrowheads) with the wild-type disc (G). (H) Derepression of *sal* (purple) within a *tup^{ex4}* clone (asterisk) and in cells surrounding it. Compare with wild-type *sal* expression (I).

tup clones lose notum markers

Next, we examined the effect of *tup* clones on genes important for notum development. *pnr* expression was removed in all first instar-induced clones (Fig. 4B), and also in most later-induced clones (~85%; Fig. 4E shows exceptions), especially in those located at the more distal part of the *pnr* domain (Fig. 4D). *Ush*, which accumulates in a region nested within the *pnr* domain (Fig. 4A), was removed in first and second instar-induced *tup* clones (Fig. 4C and not data shown), and was partially lost in third instar-induced clones. However, in large first instar-induced clones, *ush* was often expressed in a subregion of the clone. This subregion coexpressed *msh* (data not shown) and usually displayed a fold of the epithelium (Fig. 4B; see also 4I). These characteristics indicate a transformation towards hinge, as *ush* is normally expressed in the hinge region of

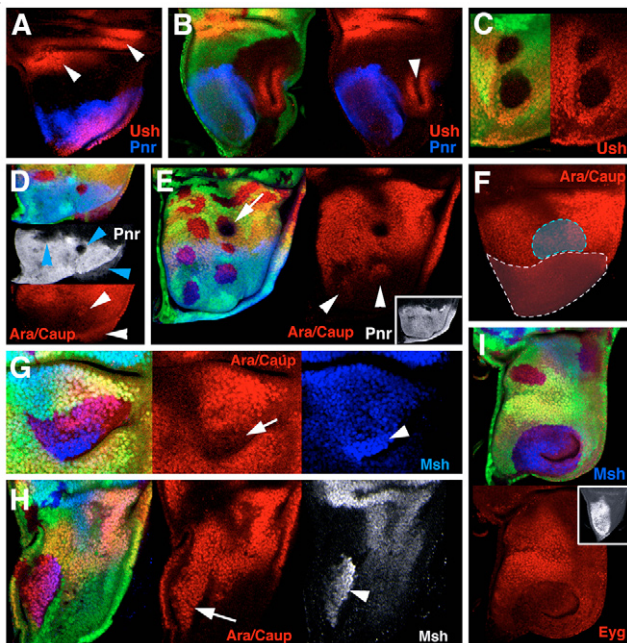


Fig. 4. Effect of *tup* clones on notum genes. *tup* clones are identified by the absence of GFP (green) expression. (A) Wild-type expression of *ush* and *pnr-Gal4* in the medial notum. Arrowheads, *ush* expression in the lateral notum and hinge regions. (B) First instar-induced *tup*^{ex4} clone. *pnr-Gal4* expression is lost. The Ush accumulation pattern (arrowhead) is similar to that in the hinge area. (C) Second instar-induced *tup*^{ex4} clones. *ush* is repressed. (D) *tup*² clones (blue arrowheads) repress *pnr-Gal4* (blue or white) and two of the *tup*² clones upregulate *ara/caup* (white arrowheads). (E) *tup*² clones. Only that clone in the central notum (arrow) represses *ara/caup* (red). Proximal clones upregulate *ara/caup* (arrowheads). Inset shows that *pnr-Gal4* expression (white or blue) persists in most clones. (F) Regions are outlined where *tup* clones lose (blue, mapped with 13 clones overlapping the area) or gain (white, mapped with 28 clones) *ara/caup* expression. (G) *tup*^{isl-1} clone. *msh-lacZ* is upregulated (arrowhead) and *ara/caup* downregulated (arrow) in the same cells. (H) Anterior *tup*² clone. *ara/caup* (arrow) and *msh-lacZ* (arrowhead) are both upregulated in some cells of the clone. (I) First instar-induced *tup*^{ex4} clone showing derepression of *msh-lacZ* and inhibition of *eyg*. Inset shows wild-type expression of *eyg*.

the disc that is transversed by several folds (Fig. 4A). *eyg* expression (Fig. 4I, inset) was lost from first instar-induced *tup* clones (Fig. 4I), but not from later-induced clones.

Notum-to-hinge transformations are also associated with the loss of Iro-C activity (Diez del Corral et al., 1999). We examined whether Iro-C products were lost in *tup* clones. Loss of Ara/Caup occurred only in a small area of the central notum (Fig. 4E-G), a region different from that where hinge structures most often arise (the lateral notum, Fig. 1A-C and see Fig. S1C in the supplementary material). Moreover, in the medial notum, *tup* clones frequently activated *ara/caup* (Fig. 4D,E), an effect probably resulting from the loss of Pnr (Calleja et al., 2000) and/or Ush, as the heterodimer Pnr-Ush (Haenlin et al., 1997) appears to be a repressor of Iro-C (Letizia et al., 2007).

Iro-C downregulates *msh* in the notum territory (Villa-Cuesta and Modolell, 2005), so the stimulation of *msh* in *tup* cells that did not express Iro-C (Fig. 4G) was expected. However, *msh* could also be

upregulated in clones in which *ara/caup* were expressed (Fig. 4H). Thus, in some instances, *tup* cells simultaneously expressed hinge and notum genes.

Chip and Ssdp are co-factors of Tup for notum specification

Since Tup can physically interact with Chip (Biryukova and Heitzler, 2005; van Meyel et al., 1999), we examined whether this co-factor was involved in the 'pronotum' function of Tup. This seemed to be the case. First instar-induced *Chip*^{ex5.5} clones located in the presumptive notum showed derepression of *zfh2* and downregulation of *eyg* (Fig. 5A), which indicated a notum-to-hinge transformation. Moreover, *msh* was also derepressed in part of the clones, but only in a non-autonomous manner (Fig. 5B). [Chip is required for *msh* expression in the hinge (Villa-Cuesta and Modolell, 2005), so the absence of *msh* activation within the clones was expected.] Some of the flies bearing *Chip* clones survived to adulthood and showed cuticular defects similar to those associated with early-induced *tup* clones, including ectopic tegulae and sensilla trichioidea (see Fig. S2B in the supplementary material).

As the above results indicate that Tup and Chip are both positive effectors of notum specification, and given that they can physically interact (Biryukova and Heitzler, 2005; van Meyel et al., 1999), we asked whether they might function as an hexameric complex with Ssdp, similar to the 2Ap-2Chip-2Ssdp complex (reviewed by Matthews and Visvader, 2003). We tested whether *Ssdp* affected notum specification. We used the hypomorphic *Ssdp*^{neo48} allele, as clones null for *Ssdp* are not recovered in adults (van Meyel et al., 2003) and hardly grow in imaginal discs even in a *Minute* heterozygous background (data not shown). Forty per cent of *Ssdp*^{neo48} clones lost *eyg* expression and gained *zfh2* expression (Fig. 5C), and adult flies bearing these clones showed cuticular defects similar to those harbouring *tup* or *Chip* clones (see Fig. S2C in the supplementary material) and, in one example, showed an outgrowth composed of proximal costa tissue (see Fig. S2D,E in the supplementary material).

In the wing, an experimental excess of Chip titrates Ap and Ssdp, prevents formation of the hexameric complex, and phenotypically mimics the loss-of-function of *Chip* (Fernández-Fúnez et al., 1998; Milán and Cohen, 1999; Rincón-Limas et al., 2000). Accordingly, we checked whether an excess of Chip also interfered with notum specification. First instar-induced clones overexpressing either *UAS-Chip* or *UAS-Chip*^{ADD} (which lacks the dimerisation domain) in the posterior and proximal notum showed loss of *eyg* expression and acquired expression of *zfh2* (Fig. 5D and data not shown).

Overexpression of *tup* and *ara* synergistically promote notum development

We compared the ability of *tup* and the Iro-C gene *ara*, overexpressed either singly or together, to impose notum development on cells normally fated to differentiate into other structures. Ubiquitous, relatively late overexpression of *UAS-tup* (*C765-Gal4* driver) (Gómez-Skarmeta et al., 1996) induced formation of notum-like tissue in the mesopleura (Fig. 6A,C) and extra notum-like bristles on the tegula (Fig. 6C). By contrast, overexpression of *UAS-ara* under the same conditions did not induce notum-like structures (Fig. 6B), although it reduced the size of the wing (see Gómez-Skarmeta et al., 1996). Overexpression of both *UAS-ara* and *UAS-tup* had a more drastic effect: the wing and wing hinge were replaced by a large structure of notum-like tissue (Fig. 6D). The notum-like structure was also present on the mesopleura, a territory where Iro-C is expressed in the wild type (Gómez-

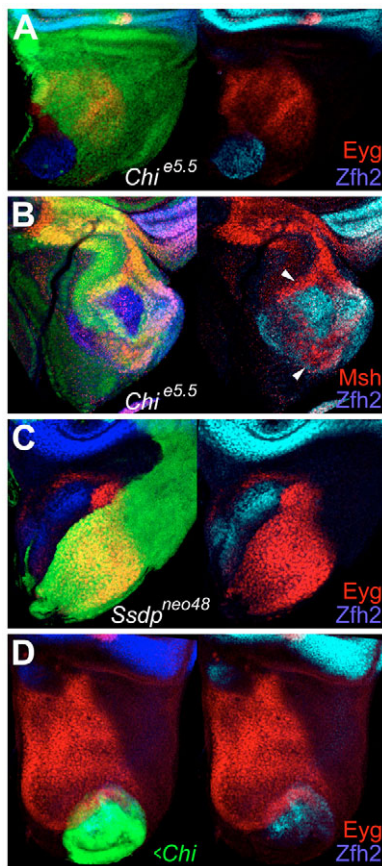


Fig. 5. *Chip* and *Ssdp* are required for notum specification.

(A,B) *Chi*^{e5.5} clones (absence of green) lose *Eyg* (red in A), accumulate *Zfh2* (blue), and non-autonomously upregulate *msh* (red in B, arrowheads). (C,D) Clones of either *M⁺ Ssdp*^{neo48} (C, absence of green) or *UAS-Chip*-expressing (D, green) cells lose *Eyg* (red) and accumulate *Zfh2* (blue).

Skarmeta et al., 1996). None of these effects were observed (data not shown) upon overexpression of a truncated *Tup* protein lacking the homeodomain (*UAS-tup*^{ΔHD}).

These transformations were verified in third instar wing discs. *UAS-tup*, but not *UAS-ara*, activated *eyg* in part of the mesopleura territory and the *DC-lacZ* transgene in some of the mesopleura cells (Fig. 6E-G). (*DC-lacZ* harbours the notum-specific DC enhancer of the AS-C) (García-García et al., 1999). Coexpression of *UAS-tup* and *UAS-ara* greatly expanded the area of expression of *eyg* to parts of the dorsal hinge, the ventral hinge, pleura and wing pouch. (Fig. 6H), consistent with the formation of large, notum-like structures.

Overexpression of both *UAS-ara* and *UAS-tup* with *dpp-Gal4*, which drives expression in a central stripe of the wing pouch (Staehling-Hampton et al., 1994), transformed the central part of the wing to notum-like tissue (Fig. 6I), whereas the anterior and posterior parts developed as wing tissue. Consistently in this phenotype, *eyg* was upregulated in the overexpression territory (Fig. 6K), whereas *Zfh2* and the wing pouch marker *Nub* (Ng et al., 1995) were lost (Fig. 6L,M, arrowheads). Moreover, this driver also directs expression in leg discs, and *eyg* was derepressed in the sternopleural region (Fig. 6J). The adults displayed notum-like structures near the coxa (Fig. 6I), which indicated a transformation of this ventral region of the body wall towards notum. This transformation was not

observed when *UAS-ara* or *UAS-tup* were overexpressed singly. Taken together, these results suggest a synergism of *Iro-C* and *tup* in promoting notum development.

***tup* and *Iro-C* are differently regulated**

In the notum territory, *Iro-C* is activated by the EGFR signalling pathway (Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002a). This led us to examine whether *tup* was also controlled by EGFR. Clones homozygous for the null *Egfr*^{1K35} allele suppressed expression of *ara/caup* as expected, but not that of *tup* (Fig. 7A). Similar results were obtained with *Ras85D*^{CΔ40b} (Fig. 7B) or *pnt*^{Δ88} clones, or by overexpressing *UAS-argos* or *UAS-Raf*^{DN} (*Raf* is also known as *phl* – Flybase) (data not shown), all of which constitute milder conditions for inhibiting the EGFR pathway. Moreover, constitutive activation of the EGFR pathway by overexpressing *UAS-Ras*^{V12}, clearly activated *ara/caup* in the hinge territory, but not so *tup* (Fig. 7E). Similar clones in the notum did not modify *tup* expression. The independence of *tup* from the EGFR pathway was also verified at developmental times close to those of notum specification (Wang et al., 2000). In second and early third instar wing discs, overexpression of *Mkp3*, a strong inhibitor of the pathway (Ruiz-Gómez et al., 2005), reduced notum growth and clearly inhibited *ara/caup*, whereas *tup* remained almost unaffected (Fig. 7C,D). Together, these data strongly argue against any control of *tup* by EGFR.

Dpp signalling negatively regulates *Iro-C* and restricts its expression to the lateral notum (Cavodeassi et al., 2002). By contrast, removal of Dpp signalling in *tkv*^{al2} clones suppressed *tup* expression (Fig. 7F), except in some of the clones located in the lateral-most region. Moreover, overexpression of *Dad*, a strong inhibitor of the Dpp pathway (Tsuneizumi et al., 1997), turned off *tup* in second and early third instar discs (Fig. 7G). Conversely, activation of the Dpp pathway by the overexpression of *UAS-tkv*^{QD}, upregulated *tup* in the medial notum, although not so in the lateral notum (Fig. 7H). We conclude that Dpp signalling is a principal positive regulator of *tup*, although additional regulators probably exist and should account for the expression of *tup* in the Dpp-insensitive regions. Hence, *Iro-C* and *tup* appear to be differently regulated in this disc.

DISCUSSION

***tup* is required for dorsal mesothorax formation**

Tup has been categorised as a prepattern factor that controls the expression of the proneural *achaete-scute* genes in the third instar wing disc (Biryukova and Heitzler, 2005). Here we show that *tup* functions earlier in the development of the dorsal mesothorax. Loss of *tup* causes a range of phenotypes, which taken together indicate interference with the assignment of cells to form notum. Thus, depending on the time of induction of the clones and their location, we observe the formation of notum-like cuticle with altered cell-cell adhesion properties, the generation of ectopic wing-hinge structures including tegulae, sclerites or sensilla typical of the proximal wing, or even the loss of the entire heminotum. Consistent with these adult phenotypes, in third instar wing discs *tup* mutant cells can upregulate genes typically expressed at high levels in the wing-hinge territory of the disc, such as *zfh2*, *msh*, *sal* and the *lacZ* insertion line *l(2)09261*. Concomitantly, notum-expressed genes such as *eyg*, *ush* and *pnr* are generally repressed, although in some cases *tup* cells may abnormally express notum and hinge genes together. These data indicate that notum *tup* cells undergo transformation towards either an altered notum fate or a hinge fate. Moreover, the activation of hinge markers in wild-type cells surrounding some *tup* clones might

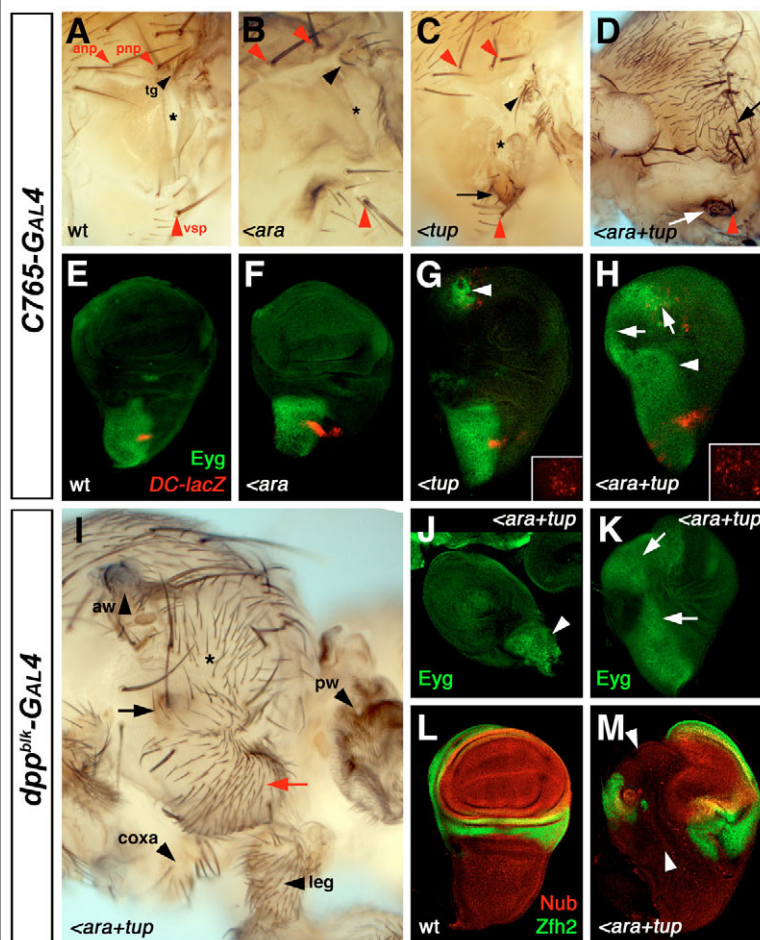


Fig. 6. Overexpression of *tup* and *ara* synergistically promote transformation towards notum.

(A-D) Mesothoracic pleurae. Red arrowheads indicate anterior (anp) and posterior (pnp) notopleural, and ventral sternopleural (vsp) bristles; black arrowheads, tegulae (tg); asterisks, vertical clefts. (A) Wild type. (B) *UAS-ara*; *C765-Gal4*. (C) *UAS-tup*/*C765-Gal4*. Arrow, notum-like outgrowth on the vertical cleft. (D) *UAS-ara*; *UAS-tup*/*C765-Gal4*. Flies were grown at 17°C. Black arrow, notum expansion towards the pleura; wing is missing. White arrow, notum-like structure adjacent to sternopleural bristles (red arrowhead). (E-H) Wing discs showing expression of *eyg* (green) and *DC-lacZ* (red). Genotypes in E-H correspond with those shown in A-D, respectively. Arrowhead (G) indicates ectopic expression in the prospective pleura (this location was verified in an optical z-section). (H) *eyg* is expressed at the dorsal hinge (arrowhead) and the wing and pleura territories (arrows). Insets show red channel images of the pleura and wing pouch areas. (I) *UAS-ara*; *UAS-tup/dpp^{blak}-Gal4* fly. Notum-like structures form on the central wing (asterisk), pleura (black arrow) and sternopleurite (red arrow). aw and pw, anterior and posterior parts of the wing, respectively. (J) *UAS-ara*; *UAS-tup/dpp^{blak}-Gal4* mesothoracic leg disc. Arrowhead, ectopic *eyg* expression. (K-M) Wild-type (L) and *UAS-ara*; *UAS-tup/dpp^{blak}-Gal4* (K,M) wing discs showing either *eyg* (K) or *nub* and *zfh2* (L,M) expression. Arrows (K) indicate that *eyg* expression is expanded to the driver territory. Arrowheads (M) indicate that *nub* and *zfh2* expression is lost from the driver territory.

reflect the presence of ectopic notum/hinge borders, which are known to promote non-autonomous effects (Diez del Corral et al., 1999; Villa-Cuesta and Modolell, 2005).

Unequivocal notum-to-hinge transformations are consistently observed in clones induced during the first larval instar. In later-induced clones, this phenotype becomes less manifest and the modified notum cuticle phenotype becomes prevalent. Accordingly, the upregulation of hinge marker genes and the converse downregulation of notum genes in the notum territory are most consistently observed in first instar-induced clones. This suggests that the requirement for the 'pronotum' function of *tup* progressively decreases as development advances. Lesions associated with *tup* clones can appear anywhere within the notum, although each particular phenotype shows a degree of topographic specificity. Interestingly, the activation of hinge genes and the repression of notum genes are best shown in early-induced clones located in the presumptive medial notum. Probably, these clones, which are normally large, do not yield adult structures as the expected large regions of mutant cuticle have not been recovered. The clones might give rise to flies lacking part or most of a heminotum. The dynamic expression pattern of *tup* fits well with the spatial distribution of these phenotypes and the early requirement for *tup* function for the development of the notum. Indeed, *tup* is expressed very early in the wing disc, when it has less than 100 cells, and the expression occurs within the region that will form the notum. We conclude that, similar to other LIM-HD factors such as Ap and the vertebrate Tup homologue Isl1 (reviewed by Hobert and Westphal, 2000; Hunter

and Rhodes, 2005), Tup is required for the proper specification of not only cell types (Biryukova and Heitzler, 2005; Thor and Thomas, 1997), but also developing territories.

Tup associates with Chip and Ssdp for notum specification

Tup is known to bind the co-factor Chip (Biryukova and Heitzler, 2005; van Meyel et al., 1999). Since, in dorsal compartment specification, Chip functions in a 2Ap-2Chip-2Sspd hexamer, we asked whether a similar 2Tup-2Chip-2Sspd complex might mediate Tup function in notum specification. Our results support this interpretation. The loss of either Chip or Ssdp upregulated hinge genes (*zfh2*, *msh*), repressed a notum marker (*eyg*), and induced cuticular defects similar to those associated with *tup* clones. Moreover, an excess of Chip would be expected to titrate Tup and/or Ssdp in incomplete complexes and mimic the loss-of-function phenotype of notum-to-hinge transformation, as was experimentally observed.

By contrast, during the later process of sensory organ formation, Tup appears to act by sequestering both Chip and Pnr, thus preventing activation of the proneural genes *achaete-scute* (Biryukova and Heitzler, 2005). This negative function of Tup does not seem relevant for notum specification, where both Tup and Chip work as positive effectors. Moreover, the Tup homeodomain is dispensable for titrating Chip and Pnr (Biryukova and Heitzler, 2005), but this is not the case for its 'pronotum' function (J.deN., unpublished). Interestingly, a missense mutation within the LIM-

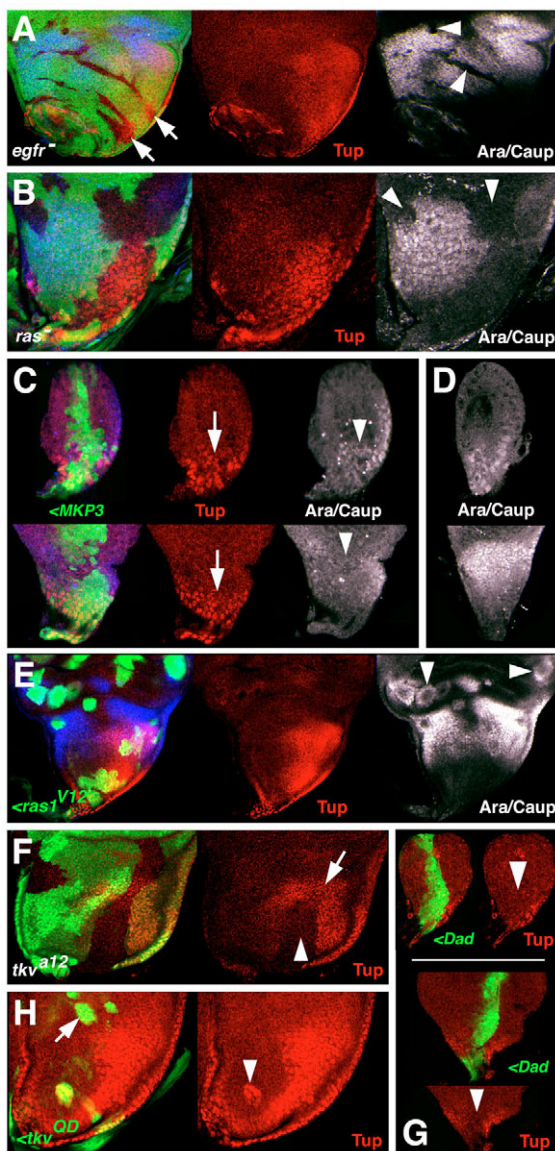


Fig. 7. Regulation of *tup* in the wing disc. Red, *Tup*; blue or white, *Ara/Caup*. (A) M^+ *Egr^{1K35}* clones (absence of green) remove *ara/caup* expression (arrowheads) but do not inhibit *tup* (arrows). (B) M^+ *Ras85D^{ΔC40b}* clones (absence of green) inhibit *ara/caup* (arrowheads), but not *tup* expression. (C) Second (top row) and early third (bottom row) instar discs. Overexpression of *Mkp3* (green) inhibits *ara/caup* (arrowhead), but not *tup* (arrow). (D) Expression of *ara/caup* in wild-type discs of similar age to those shown in C. (E) Clones expressing *UAS-Ras1^{V12}* (green) activate *ara/caup* (arrowheads) in the wing hinge. *tup* is not activated, or only so at very low levels. (F) A *tkv^{Δ12}* clone (absence of green) removes *tup* expression in the medial (arrowhead), but not in the lateral (arrow) notum. (G) Second (top) and early third (bottom) instar discs. Overexpression of *UAS-Dad* (green) blocks *Tup* accumulation (arrowheads). Compare with Fig. 2B,C. (H) Clones expressing *UAS-tkv^{QD}* (green) activate *tup* in the medial (arrowhead), but not in the lateral (arrow) notum.

interacting domain of *Chip* (*Chip^E*) severely reduces its ability to interact with *Tup* and suppresses the negative regulation by *Tup* of bristle formation (Biryukova and Heitzler, 2005). However, homozygous *Chip^E* flies have no defects in notum specification

(Romain et al., 2000). This suggests that a residual interaction between *Chip^E* and *Tup* might persist, as additionally suggested by the suppression of the extra bristles present in *Chip^E* individuals by *UAS-tup* overexpression (Biryukova and Heitzler, 2005). A weak interaction between *Tup* and *Chip*, which might only permit the formation of low levels of hexameric complex, might still allow proper notum specification. This suggestion agrees with the fact that *tup^{d03613}*, a strong hypomorphic allele (as substantiated by its embryonic lethality over the null *tup^{ex4}*; J.deN., unpublished), allows proper notum formation in homozygosis (Biryukova and Heitzler, 2005).

***tup* and Iro-C cooperate in notum development**

Similarly to *tup*, *Iro-C* also has a 'pronotum' function. However, their roles are not entirely equivalent. Anywhere within the notum territory, loss of *Iro-C* during first or second instar induces a clear switch to hinge fate (Diez del Corral et al., 1999). By contrast, loss of *tup* causes an assortment of different combinations of derepressed hinge genes and repressed notum genes. Moreover, many *tup* clones induced during the second larval instar, and even some induced in the first, can develop recognisable notum cuticle. Thus, we propose that *tup* reinforces/stabilises the commitment of cells to develop as notum, a commitment imposed mainly by *Iro-C*. This reinforcement or stabilisation might be most necessary in the proximal part of the disc, where expression of *ara/caup* ceases after the second instar, but that of *tup* persists. This might account for the derepression of hinge genes being most manifest in this region. Depending on the location and time of *Tup* deprivation, its loss may be inconsequential or lead to a partial or even a complete loss of notum commitment. Such diversity of consequences led us to explore whether *tup* might act on target genes by affecting chromatin remodelling. However, no genetic interactions have been found with Polycomb (*Pc*, *Scr+Pcl+esc*) or trithorax (*trx*, *osa*, *brm*, *Trl*, *lawc*) group genes (J.deN., unpublished).

In contrast to the absolute requirement for *Iro-C* for notum specification, overexpression of *UAS-ara* can impose a notum fate only on the wing anlage, and only when provided early in the development of the disc (Aldaz et al., 2003; Wang et al., 2000) (R. Diez del Corral, PhD thesis, Universidad Autónoma de Madrid, 1998). An extra notum with mirror-image disposition versus the extant notum is generated at the expense of the wing, a phenotype identical to that resulting from early deprivation of *Wg* function (Couso et al., 1993; Morata and Lawrence, 1977; Ng et al., 1996; Sharma and Chopra, 1976). As *UAS-ara* overexpression can interfere with *wg* expression (R. Diez del Corral, PhD thesis, Universidad Autónoma de Madrid, 1998), *Wg* deprivation probably explains the formation of the extra notum. Thus, by itself, overexpression of *UAS-ara* probably lacks a genuine potential for imposing the notum fate. Similar notum duplications arise upon early and strong overexpression of *UAS-tup* (*MD638*, *dpp-Gal4* and *ptc-Gal4* drivers) and, again, they probably result from inhibition of *Wg* activity (J.deN., unpublished). Consistent with this interpretation, weaker and later expression of either *UAS-tup* or *UAS-ara* (*C765* driver) (Gómez-Skarmeta et al., 1996) has little or no capacity to promote notum fate. However, when coexpressed, these transgenes are effective in imposing the notum fate and this should not be attributed to *Wg* depletion. Indeed, the transformation consists of an expansion of the notum tissue (Fig. 6D), rather than a notum duplication (Morata and Lawrence, 1977). Moreover, as detected by the onset of the ectopic expression of notum markers (*eyg*, *DC-lacZ*), the transformation occurs in late third instar discs (J.deN., unpublished) that have a nearly wild-type morphology and a distinguishable wing pouch (Fig.

6H). This indicates that these markers are activated in territories previously specified as wing, hinge or pleura, and subsequently forced to acquire notum identity. Moreover, overexpression of the Wg pathway antagonists *UAS-Axin* or *UAS-dTCF^{DN}* (*dTCF* is also known as *pan* – Flybase) with the same driver failed to transform wing towards notum (J.deN., unpublished). Finally, the activation of *eyg* and the formation of notum tissue in the sternopleurite, a derivative of the leg disc, also attest to the capacity of *tup* plus *ara* to commit cells to develop as notum.

EGFR and Dpp signalling pathways collaborate in notum specification

It is well established that signalling by the EGFR pathway is essential for notum development. Its inhibition prevents activation of Iro-C and the growth of the notum territory (Simcox et al., 1996; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002b). By contrast, Dpp negatively regulates Iro-C and restricts its domain of expression at both its distal and proximal borders (Cavodeassi et al., 2002). Our data indicate a novel function of Dpp in notum development; namely, the activation or maintenance of *tup* expression in second and third instar discs. In the notum region of the early disc, Dpp signalling occurs at low levels (Cavodeassi et al., 2002), but our results suggest that these are sufficient for activating *tup*. Expression of *tup* is largely independent on EGFR signalling. Thus, EGFR and Dpp signalling seem to cooperate in specifying notum identity to the cells of the proximal part of the disc by activating their respective ‘pronotum’ downstream genes, Iro-C and *tup*.

We are grateful to S. Campuzano, F. Cavodeassi, J. Culi, J. F. de Celis, F. J. Díaz-Benjumea, J. L. Gómez-Skarmeta, M. Ruiz-Gómez, E. Sánchez-Herrero, E. Villa-Cuesta and colleagues of the J.M. laboratory for advice on the work and constructive criticism of the manuscript; to M. J. García-García for discovering the expression of *tup* in the wing disc; and to S. Thor, D. O’Keefe, S. Artavanis-Tsakonas, P. Heitzler, D. van Meyel, A. Baonza, J. Terriente, and the Bloomington and Tübingen Stock Centres for providing reagents and stocks. A predoctoral fellowship from Comunidad Autónoma de Madrid to J.d.N. is acknowledged. This work was supported by grants from Dirección General de Investigación Científica y Técnica (BMC2002-411, BFU2005-02888) and an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/134/9/1779/DC1>

References

- Aldaz, S., Morata, G. and Azpiazu, N. (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. *Development* **130**, 4473-4482.
- Averof, M. and Cohen, S. M. (1997). Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* **385**, 627-630.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech. Dev.* **91**, 5-17.
- Baek, K. H., Fabian, J. R., Sprenger, F., Morrison, D. K. and Ambrosio, L. (1996). The activity of D-raf in torso signal transduction is altered by serine substitution, N-terminal deletion, and membrane targeting. *Dev. Biol.* **175**, 191-204.
- Biryukova, I. and Heitzler, P. (2005). The *Drosophila* LIM-homeodomain protein Islet antagonizes pro-neural cell specification in the peripheral nervous system. *Dev. Biol.* **288**, 559-570.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. and Simcox, A. (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-670.
- Calleja, M., Herranz, H., Estella, C., Casal, J., Lawrence, P., Simpson, P. and Morata, G. (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the *pannier* gene of *Drosophila*. *Development* **127**, 3971-3980.
- Calleja, M., Renaud, O., Usui, K., Pistillo, D., Morata, G. and Simpson, P. (2002). How to pattern an epithelium: lessons from *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene* **292**, 1-12.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Gómez-Skarmeta, J. L. (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* **128**, 2847-2855.
- Cavodeassi, F., Rodríguez, I. and Modolell, J. (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* **129**, 3815-3823.
- Chen, L., Segal, D., Hukriede, N. A., Podtelejnikov, A. V., Bayarsaihan, D., Kennison, J. A., Ogryzko, V. V., Dawid, I. B. and Westphal, H. (2002). Ssd proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14320-14325.
- Couso, J. P., Bate, M. and Martínez-Arias, A. (1993). A wingless-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* **259**, 484-489.
- Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P. and Haenlin, M. (1997). *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3083-3095.
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**, 996-1008.
- D’Alessio, M. and Frasch, M. (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech. Dev.* **58**, 217-231.
- Das, P., Maduzia, L. L., Wang, H., Finelli, A. L., Cho, S. H., Smith, M. M. and Padgett, R. W. (1998). The *Drosophila* gene *Medea* demonstrates the requirement for different classes of Smads in dpp signaling. *Development* **125**, 1519-1528.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. (1999). Regulation of the *spalt/spalt-related* gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* **126**, 2653-2662.
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M. and Sánchez-Herrero, E. (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **123**, 860-867.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gómez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. and Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**, 1754-1761.
- Fernández-Fúnez, P., Lu, C. H., Rincón-Limas, D. E., García-Bellido, A. and Botas, J. (1998). The relative expression amounts of *apterous* and its co-factor *dlx/Chip* are critical for dorso-ventral compartmentalization in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* **17**, 6846-6853.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H. and Schulz, R. A. (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7342-7347.
- García-García, M. J., Romain, P., Simpson, P. and Modolell, J. (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development* **126**, 3523-3532.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferré-Marcó, D. and Modolell, J. (1996). *aracuan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- Haenlin, M., Cubadda, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. and Romain, P. (1997). Transcriptional activity of *Pannier* is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3096-3108.
- Hobert, O. and Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* **16**, 75-83.
- Howes, R., Wasserman, J. D. and Freeman, M. (1998). *In vivo* analysis of Argos structure-function. Sequence requirements for inhibition of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 4275-4281.
- Hunter, C. S. and Rhodes, S. J. (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol. Biol. Rep.* **32**, 67-77.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M. (1998). Ectopic expression of activated Ras 1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.
- Letizia, A., Barrio, R. and Campuzano, S. (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* **134**, 1337-1346.
- Mann, R. S. and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 243-271.
- Matthews, J. M. and Visvader, J. E. (2003). LIM-domain-binding protein 1, a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* **4**, 1132-1137.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J. B., Doe, C. Q. and Mellerick, D. M. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev.* **12**, 3603-3612.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. and Simon, M. A. (1997).

- mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorso-ventral border of the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 1073-1082.
- Milán, M. and Cohen, S. M. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: a tetramer of dLDB and Apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Mol. Cell* **4**, 267-273.
- Morata, G. and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-221.
- Morata, G. and Lawrence, P. A. (1977). The development of *wingless*, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **56**, 227-240.
- Nagel, A. C., Maier, D. and Preiss, A. (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **212**, 93-98.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1995). *nubbin* encodes a POU-domain protein required for proximal-distal patterning in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 589-599.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M. (1996). Specification of the wing by localized expression of the *wingless* protein. *Nature* **381**, 316-318.
- Nishioka, N., Nagano, S., Nakayama, R., Kiyonari, H., Ijiri, T., Taniguchi, K., Shawlot, W., Hayashizaki, Y., Westphal, H., Behringer, R. R. et al. (2005). Ssd1 regulates head morphogenesis of mouse embryos by activating the Lim1-Ldb1 complex. *Development* **132**, 2535-2546.
- O'Keefe, D. D., Thor, S. and Thomas, J. B. (1998). Function and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing development. *Development* **125**, 3915-3923.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* **36**, 288-292.
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M. and Simpson, P. (1993). *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* **119**, 1277-1291.
- Ramain, P., Khechumian, R., Khechumian, K., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P. (2000). Interactions between Chip and the Achaete/Scute-Daughterless heterodimers are required for Pannier-driven proneural patterning. *Mol. Cell* **6**, 781-790.
- Rincón-Limas, D. E., Lu, C. H., Canal, I. and Botas, J. (2000). The level of DLDB/CHIP controls the activity of the LIM homeodomain protein apterous: evidence for a functional tetramer complex in vivo. *EMBO J.* **19**, 2602-2614.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ruiz-Gómez, A., López-Varea, A., Molnar, C., de la Calle-Mustienes, E., Ruiz-Gómez, M., Gómez-Skarmeta, J. L. and de Celis, J. F. (2005). Conserved cross-interactions in *Drosophila* and *Xenopus* between Ras/MAPK signaling and the dual-specificity phosphatase MKP3. *Dev. Dyn.* **232**, 695-708.
- Sánchez, L., Casares, F., Gorfinkel, N. and Guerrero, I. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. II. Roles of the genes *hedgehog*, *deceapentaplegic* and *wingless*. *Dev. Genes Evol.* **207**, 229-241.
- Sato, A. and Saigo, K. (2000). Involvement of *pannier* and *u-shaped* in regulating Decapentaplegic-dependent *wingless* expression in developing *Drosophila* notum. *Mech. Dev.* **93**, 127-138.
- Sharma, R. P. and Chopra, V. L. (1976). Effect of *wingless* (*wg*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **48**, 461-465.
- Simcox, A. A., Grumbling, G., Schnepf, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. and Shearn, A. (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of vein, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev. Biol.* **177**, 475-489.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **5**, 984-995.
- Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U. and Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* **120**, 535-544.
- Staebling-Hampton, K., Jackson, P. D., Clark, M. J., Brand, A. H. and Hoffmann, F. M. (1994). Specificity of bone morphogenetic protein related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos by *decapentaplegic* but not *60A*. *Cell Growth Differ.* **5**, 585-593.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat. Genet.* **36**, 283-287.
- Thor, S. and Thomas, J. B. (1997). The *Drosophila* *islet* gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron* **18**, 393-409.
- Tomoyasu, Y., Ueno, N. and Nakamura, M. (2000). The Decapentaplegic morphogen gradient regulates the notal *wingless* expression through induction of *pannier* and *u-shaped* in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **96**, 37-49.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., Kornberg, T. B., Christian, J. L. and Tabata, T. (1997). *Daughters against dpp* modulates *dpp* organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* **389**, 627-631.
- van Meyel, D. J., O'Keefe, D. D., Jurata, L. W., Thor, S., Gill, G. N. and Thomas, J. B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Mol. Cell* **4**, 259-265.
- van Meyel, D. J., Thomas, J. B. and Agulnick, A. D. (2003). Ssd proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development* **130**, 1915-1925.
- Villa-Cuesta, E. and Modolell, J. (2005). Mutual repression between *msh* and *Iro-C* is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development* **132**, 4087-4096.
- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G. (2000). Dual role for epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev.* **14**, 2271-2276.
- Whitworth, A. J. and Russell, S. (2003). Temporally dynamic response to *Wingless* directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **254**, 277-288.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-1376.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-1368.

bibliografía

- Agnès, F., Suzanne, M. y Noselli, S. (1999). The *Drosophila* JNK pathway controls morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* **126**, 5453-62.
- Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B. y Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384**, 270-2.
- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T. y Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* **385**, 257-60.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. y Hooper, J. E. (1996). The *Drosophila* *smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the Hedgehog signal. *Cell* **86**, 221-232.
- Aldaz, S., Morata, G. y Azpiazu, N. (2003). The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. *Development* **130**, 4473-82.
- Aldaz, S., Morata, G. y Azpiazu, N. (2005). Patterning function of *homothorax/extradenticle* in the thorax of *Drosophila*. *Development* **132**, 439-46.
- Allan, D. W. y Thor, S. (2003). Together at last: bHLH and LIM-HD regulators cooperate to specify motor neurons. *Neuron* **38**, 675-7.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. y Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-32.
- Ashe, H. L., Mannervik, M. y Levine, M. (2000). Dpp signaling thresholds in the dorsal ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 3305-12.
- Averof, M. y Cohen, S. M. (1997). Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* **385**, 627-30.
- Aza-Blanc, P. y Kornberg, T. B. (1999). Ci: a complex transducer of the *hedgehog* signal. *Trends Genet.* **15**, 458-62.
- Azpiaz, N. y Morata, G. (2000). Function and regulation of *homothorax* in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 2685-93.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech. Dev.* **91**, 5-17.
- Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H. P., Andersen, B. y Rosenfeld, M. G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* **11**, 1370-80.
- Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., 2nd, Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K. M., Sawchenko, P. E. y Rosenfeld, M. G. (1995). P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *PNAS* **92**, 2720-4.
- Bach, I., Rodríguez-Esteban, C., Carriere, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D. W., Glass, C. K., Andersen, B., Izpisua-Belmonte, J. C. y Rosenfeld, M. G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* **22**, 394-9.
- Baena-López, L. A. y García-Bellido, A. (2003). Genetic requirements of *vestigial* in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197-208.
- Baena-López, L. A., Pastor-Pareja, J. C. y Resino, J. (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 6497-506.
- Baker, N. E. (1988). Transcription of the segment-polarity gene *wingless* in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal *wg* mutation. *Development* **102**, 489-97.
- Baonza, A., Roch, F. y Martín-Blanco, E. (2000). DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *PNAS* **97**, 7331-35.
- Basler, K. y Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. *Nature* **368**, 208-14.
- Bate, M. y Martínez-Arias, A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**, 755-61.
- Bayarsaihan, D., Soto, R. J. y Lukens, L. N. (1998). Cloning and characterization of a novel sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein. *Biochem. J.* **331**, 447-52.
- Becker, T., Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Schluter, A., Becker, C. G., Peirano, R. I. y Bach, I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. *Mech. Dev.* **117**, 75-85.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. y Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **3**, 1288-300.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepard, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L. y Jan, Y. N. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes & Dev.* **3**, 1273-87.
- Biryukova, I. y Heitzler, P. (2005). The *Drosophila* LIM-homeo domain protein Islet antagonizes pro-

- neural cell specification in the peripheral nervous system. *Dev Biol* **288**, 559-70.
- Black, B. L.** (2007). Transcriptional pathways in second heart field development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 67-76.
- Blair, S. S.** (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* **17**, 299-309.
- Blair, S. S.** (2003). Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development* **130**, 5065-72.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. y Zavortink, M.** (1994). The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **120**, 1805-15.
- Blair, S. S. y Ralston, A.** (1997). Smoothened-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development* **124**, 4053-63.
- Bodmer, R., Carretto, R. y Jan, Y. N.** (1989). Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos: DNA replication patterns and cell lineages. *Neuron* **3**, 21-32.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E. y Bagañá, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev. Biol.* **280**, 73-86.
- Botas, J., Moscoso del Prado, J. y García-Bellido, A.** (1982). Gene-dose titration analysis in the search of trans-regulatory genes in *Drosophila*. *EMBO J.* **1**, 307-10.
- Brand, A. H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Broihier, H. T. y Skeath, J. B.** (2002). *Drosophila* homeodomain protein dHb9 directs neuronal fate via crossrepressive and cell-nonautonomous mechanisms. *Neuron* **35**, 39-50.
- Brook, W. J. y Cohen, M.** (1996). Antagonistic interactions between *wingless* and *decapentaplegic* responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* **273**, 1373-7.
- Brower, D. L.** (1987). *Ultrabithorax* gene expression in *Drosophila* imaginal discs and larval nervous system. *Development* **101**, 83-92.
- Brückner, K., Perte, L., Clausen, H. y Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marqués, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massagué, J., O'Connor, M. B. y Gelbart, W. M.** (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the *saxophone* and *thick veins* genes of *Drosophila*. *Cell* **78**, 251-61.
- Brunk, B. P., Martin, E. C. y Adler, P. N.** (1991). Molecular genetics of the *Posterior sex combs/Suppressor 2 of zeste* region of *Drosophila*: aberrant expression of the *Suppressor 2 of zeste* gene results in abnormal bristle development. *Genetics* **128**, 119-32.
- Bryant, P. J.** (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: Fate map, regeneration and duplication. *J. Exp. Zool.* **193**, 49-78.
- Bryant, P. J.** (1978). Pattern formation in imaginal discs. In *The genetics and biology of Drosophila.*, vol. 2c (ed. M. Ashburner y T. R. F. Wright), pp. 230-335. London: Academic Press.
- Bryant, P. J.** (1988). Localized cell death caused by mutations in a *Drosophila* gene coding for a transforming growth factor-beta homolog. *Dev. Biol.* **128**, 386-95.
- Bryant, P. J. y Levinson, P.** (1985). Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev. Biol.* **107**, 355-63.
- Bryant, P. J. y Simpson, P.** (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Quarterly Rev. Biol.* **59**, 387-415.
- Burge, C. B., Tuschl, T. y Sharp, P. A.** (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. In *The RNA world II*, (ed. R. F. Gestland, Cech, T. y Atkins, J. F.), pp. 525-560. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Burke, R. y Basler, K.** (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* **122**, 2261-9.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. y Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. y Evans, S.** (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* **5**, 877-89.
- Calleja, M., Herranz, H., Estella, C., Casal, J., Lawrence, P., Simpson, P. y Morata, G.** (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the *pannier* gene of *Drosophila*. *Development* **127**, 3971-80.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.
- Campbell, G. y Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by *brinker*. *Cell* **96**, 553-62.
- Campuzano, S. y Modolell, J.** (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene

complex. *Trends Genet.* **8**, 202-7.

Capdevila, J., Estrada, M. P., Sánchez-Herrero, E. y Guerrero, I. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene *patched* interacts with *decapentaplegic* in wing development. *EMBO J.* **13**, 71-82.

Capdevila, J. y Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signal molecule *decapentaplegic* induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* **13**, 4459-68.

Carroll, S. B. y Whyte, J. S. (1989). The role of the *hairy* gene during *Drosophila* morphogenesis: stripes in imaginal discs. *Genes Dev.* **3**, 905-16.

Casares, F. y Mann, R. S. (2000). A dual role for *homothorax* in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* **127**, 1499-508.

Cavodeassi, F., Rodríguez, I. y Modolell, J. (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* **129**, 3815-23.

Certel, S. J. y Thor, S. (2004). Specification of *Drosophila* motoneuron identity by the combinatorial action of POU and LIM-HD factors. *Development* **131**, 5429-39.

Cifuentes, F. J. y García-Bellido, A. (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the *nubbin* gene. *PNAS* **94**, 11405-10.

Cimbora, D. M. y Sakonju, S. (1995). *Drosophila* midgut morphogenesis requires the function of the segmentation gene *odd-paired*. *Dev. Biol.* **169**, 580-95.

Claros, G., Saladrigas, V. y González-Halphen, D. (2003). Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular (3.^a entrega). *Panace@* **IV**, 136-42.

Cliffe, A., Hamada, F. y Bienz, M. (2003). A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr. Biol.* **13**, 960-6.

Clifford, R. y Schüpbach, T. (1994). Molecular analysis of the *Drosophila* EGF receptor homolog reveals that several genetically defined classes of alleles cluster in subdomains of the receptor protein. *Genetics* **137**, 531-50.

Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. y Cohen, S. M. (1992). *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 715-29.

Cole, E. S. y Palka, J. (1982). The pattern of campaniform sensilla on the wing and haltere of *Drosophila melanogaster* and several of its homeotic mutants. *J. Embryol. exp. Morph.* **71**, 41-61.

Coleman, K. J., Poole, S. J., Weir, M. P., Soeller, W. C. y Kornberg, T. B. (1987). The *invected* gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the *engrailed* gene. *Genes Dev.* **1**, 19-28.

Collier, J. R., Monk, N. A., Maini, P. K. y Lewis, J. H. (1996). Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* **183**, 429-46.

Couso, J. P., Bate, M. y Martínez-Arias, A. (1993). A *wingless*-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* **259**, 484-9.

Crosby, M. A., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Zhang, P. y Gelbart, W. M. (2007). FlyBase: genomes by the dozen. *Nucleic Acids Res.* **35**, D486-91.

Cubadda, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Ramain, P., Gelbart, W., Simpson, P. y Haenlin, M. (1997). *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3083-95.

Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. y Modolell, J. (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* **5**, 996-1008.

Cubas, P. y Modolell, J. (1992). The *extramacrochaetae* gene provides information for sensory organ patterning. *EMBO J.* **11**, 3385-93.

Culí, J. y Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by *Notch* signaling. *Genes Dev.* **12**, 2036-47.

Curtiss, J. y Heilig, J. S. (1997). *Arrowhead* encodes a LIM homeodomain protein that distinguishes subsets of *Drosophila* imaginal cells. *Dev. Biol.* **190**, 129-41.

Curtiss, J. y Heilig, J. S. (1998). DeLIMiting development. *Bioessays* **20**, 58-69.

Chen, L., Segal, D., Hukriede, N. A., Podtelejnikov, A. V., Bayarsaihan, D., Kennison, J. A., Ogryzko, V. V., Dawid, I. B. y Westphal, H. (2002). Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 14320-5.

Chen, Y. y Struhl, G. (1996). Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-63.

Chen, Y. y Struhl, G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* **125**, 4943-8.

Chou, T.-b. y Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-9.

Chou, T. B., Noll, E. y Perrimon, N. (1993). Autosomal *P[ovo^{D1}]* dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimaeras. *Development* **119**, 1359-69.

- Chou, T. B. y Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-53.
- D'Alessio, M. y Frasch, M. (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech. Dev.* **58**, 217-31.
- Dahmann, C. y Basler, K. (1999). Compartment boundaries at the edge of development. *Trends Genet.* **15**, 320-6.
- Dahmann, C. y Basler, K. (2000). Opposing transcriptional outputs of Hedgehog signaling and Engrailed control compartmental cell sorting at the *Drosophila* A/P boundary. *Cell* **100**, 411-22.
- Dambly-Chaudière, C. y Leyns, L. (1992). The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 85-91.
- Dawid, I. B., Breen, J. J. y Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* **14**, 156-62.
- Dawid, I. B., Toyama, R. y Taira, M. (1995). LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 295-306.
- de Celis, J. F., Barrio, R. y Kafatos, F. (1999). Regulation of the *spalt/spalt-related* gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* **126**, 2653-62.
- de Celis, J. F., Barrio, R. y Kafatos, F. C. (1996a). A gene complex acting downstream of *dpp* in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-24.
- de Celis, J. F. y García-Bellido, A. (1994). Roles of the *Notch* gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mech. Dev.* **46**, 109-22.
- de Celis, J. F., García-Bellido, A. y Bray, S. J. (1996b). Activation and function of *Notch* at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.
- de Celis, J. F., Llimargas, M. y Casanova, J. (1995). *ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 3405-16.
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M. y Sánchez-Herrero, E. (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **123**, 860-7.
- Deak, I. I. (1978). Thoracic duplications in the mutant *wingless* of *Drosophila* and their effect on muscles and nerves. *Dev. Biol.* **66**, 422-41.
- Deane, J. E., Ryan, D. P., Sunde, M., Maher, M. J., Guss, J. M., Visvader, J. E. y Matthews, J. M. (2004). Tandem LIM domains provide synergistic binding in the LMO4:Ldb1 complex. *EMBO J.* **23**, 3589-98.
- Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.
- Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorso-ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.
- Díaz-Benjumea, F. J. y García-Bellido, A. (1990). Behaviour of cells mutant for an EGF receptor homologue of *Drosophila* in genetic mosaics. *Proc. R. Soc. Lond.* **242**, 36-44.
- Diez del Corral, R. (1998). El complejo Iroquois interviene en la formación del notum y las venas del ala de *Drosophila melanogaster*. *Tesis doctoral*.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gómez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. y Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**, 1754-61.
- Doctor, J. S., Jackson, P. D., Rashka, K. E., Visalli, M. y Hoffmann, F. M. (1992). Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **151**, 491-505.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev.* **10**, 421-34.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S. y Rørth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* **107**, 17-26.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Eaton, S. y Kornberg, T. B. (1990). Repression of *ci^D* in posterior compartments of *Drosophila* by *engrailed*. *Genes Dev.* **4**, 1068-77.
- Eeckhoutte, J., Briche, I., Kurowska, M., Formstecher, P. y Laine, B. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha ligand binding and F domains mediate interaction and transcriptional synergy with the pancreatic islet LIM HD transcription factor Isl1. *J. Mol. Biol.* **364**, 567-81.
- Elfring, L. K., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S. J., Waldrip, W. R., Daubresse, G., DePace, A. y cols. (1998). Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**, 251-65.
- Ellis, H. M., Spann, D. R. y Posakony, J. W. (1990). *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* **61**, 27-38.
- Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D. M., Eggleston, W. B. y Sved, J. (1990). High-frequency P element loss

in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* **62**, 515-25.

Escudero, L. M., Caminero, E., Schulze, K. L., Bellen, H. J. y Modolell, J. (2005). Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural *achaete/scute* genes of *Drosophila*. *Development* **132**, 1211-22.

Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. y Karch, F. (1994). The *Trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* **371**, 806-8.

Fausto-Sterling, A. y Hsieh, L. (1987). In vitro culture of *Drosophila* imaginal disc cells: aggregation, sorting out, and differentiative abilities. *Dev. Biol.* **120**, 284-93.

Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. T. y Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-34.

Fernández-Fúnez, P., Lu, C. H., Rincón-Limas, D. E., García-Bellido, A. y Botas, J. (1998). The relative expression amounts of *apterous* and its co-factor *dLdb/Chip* are critical for dorso-ventral compartmentalization in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* **17**, 6846-53.

Ferris, G. F. (1965). External morphology of the adult. In *Biology of Drosophila.*, (ed. M. Demerec), pp. 368-419. New York: John Wiley and Sons.

Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cooke, N. E. y Liebhaver, S. A. (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *PNAS* **91**, 10655-9.

Fisher, A. y Caudy, M. (1998). The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *Bioessays* **20**, 298-306.

Fjose, A., McGinnis, W. J. y Gehring, W. J. (1985). Isolation of a homoeo box-containing gene from the *engrailed* region of *Drosophila* and the spatial distribution of its transcripts. *Nature* **313**, 284-9.

Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H. y Schulz, R. A. (2001). The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 7342-7.

Frank, L. H. y Rushlow, C. (1996). A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* **122**, 1343-52.

Freyd, G., Kim, S. K. y Horvitz, H. R. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**, 876-9.

Galko, M. J. y Krasnow, M. A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol.* **2**, E239.

García-Alonso, L. A. y García-Bellido, A. (1988). *extramacrochaetae*, a trans-acting gene of the *achaete-scute* complex of *Drosophila* involved in cell communication. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **197**, 328-38.

García-Bellido, A. (1966). Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **14**, 278-306.

García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found. Symp.* **0**, 161-82.

García-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971a). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **26**, 264-76.

García-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971b). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **24**, 61-87.

García-Bellido, A., Morata, G. y Ripoll, P. (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **48**, 132-47.

García-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disc of *Drosophila*. *Nature New Biol.* **245**, 251-3.

García-Bellido, A. y Santamaría, P. (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant *engrailed* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**, 87-104.

García-García, M. J., Romain, P., Simpson, P. y Modolell, J. (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development* **126**, 3523-32.

Garrell, J. y Campuzano, S. (1991). The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays* **13**, 493-8.

Garrell, J. y Modolell, J. (1990). The *Drosophila extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* **61**, 39-48.

Gay, F., Anglade, I., Gong, Z. y Salbert, G. (2000). The LIM/homeodomain protein islet-1 modulates estrogen receptor functions. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1627-48.

Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. (1988). From DNA to form: the *achaete-scute* complex. *Genes Dev.* **2**, 495-501.

Ghysen, A. y Dambly-Chaudière, C. (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet.* **5**, 251-5.

Giagtzoglou, N., Alifragis, P., Koumbanakis, K. A. y Delidakis, C. (2003). Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* **130**, 259-70.

- Giagtzoglou, N., Koumbanakis, K. A., Fullard, J., Zarifi, I. y Delidakis, C. (2005). Role of the Sc C terminus in transcriptional activation and E(spl) repressor recruitment. *J. Biol. Chem.* **280**, 1299-305.
- Gibson, M. C. y Perrimon, N. (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-9.
- Gill, G. N. (1995). The enigma of LIM domains. *Structure* **3**, 1285-9.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E. y cols. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-36.
- Goldman-Levi, R., Miller, C., Greenberg, G., Gabai, E. y Zak, N. B. (1996). Cellular pathways acting along the germband and in the amnioserosa may participate in germband retraction of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 1043-51.
- Golic, K. G. y Golic, M. M. (1996). Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* **144**, 1693-711.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. y Modolell, J. (2003). Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 587-98.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Díez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferrés-Marcó, D. y Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culi, J., Ferrés-Marcó, M. D., Beamonte, D. y Modolell, J. (1995). Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev.* **9**, 1869-82.
- Goriely, A., Dumont, N., Dambly-Chaudière, C. y Ghysen, A. (1991). The determination of sense organs in *Drosophila*: effect of the neurogenic mutations in the embryo. *Development* **113**, 1395-1404.
- Grimm, S. y Pflugfelder, G. O. (1996). Control of the gene *optomotor-blind* in *Drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science* **271**, 1601-4.
- Guerra, M., Postlethwait, J. H. y Schneiderman, H. A. (1973). The development of the imaginal abdomen of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **32**, 361-72.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. y Guerrero, I. (1995). The function of *engrailed* and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Haenlin, M., Cubbada, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P. y Romain, P. (1997). Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3096-108.
- Halfon, M. S., Gisselbrecht, S., Lu, J., Estrada, B., Keshishian, H. y Michelson, A. M. (2002). New fluorescent protein reporters for use with the *Drosophila* Gal4 expression system and for vital detection of balancer chromosomes. *Genesis* **34**, 135-8.
- Hannah-Alava, A. (1958). Morphology and chaetotaxy of the legs of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* **103**, 281-310.
- Hartenstein, V. y Posakony, J. W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**, 389-405.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T. y Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. *Development* **118**, 105-15.
- Heitzler, P. y Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **64**, 1083-92.
- Heitzler, P., Vanolst, L., Biryukova, I. y Romain, P. (2003). Enhancer-promoter communication mediated by Chip during Pannier-driven proneural patterning is regulated by Osa. *Genes Dev.* **17**, 591-6.
- Hiratani, I., Yamamoto, N., Mochizuki, T., Ohmori, S. Y. y Taira, M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development* **130**, 4161-75.
- Hobert, O. y Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* **16**, 75-83.
- Hoodless, P. A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M. B., Attisano, L. y Wrana, J. L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* **85**, 489-500.
- Hou, X. S., Chou, T. B., Melnick, M. B. y Perrimon, N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate Raf in a Ras-independent pathway. *Cell* **81**, 63-71.
- Howes, R., Wasserman, J. D. y Freeman, M. (1998). *In vivo* analysis of Argos structure-function. Sequence requirements for inhibition of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 4275-81.
- Huang, F., Dambly-Chaudière, C. y Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* **111**, 1087-95.
- Hunter, C. S. y Rhodes, S. J. (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol. Biol. Rep.* **32**, 67-77.
- Ingham, P. W. y Martinez Arias, A. (1992). Boundaries and fields in early embryos. *Cell* **68**, 221-35.
- Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K. y Kawabata, M. (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular

- characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2145-56.
- Irvine, K. D. y Rauskolb, C.** (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 189-214.
- Irvine, K. D. y Wieschaus, E.** (1994). *fringe*, a boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* **79**, 595-606.
- Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M. y Hanafusa, H.** (2004). PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis. *EMBO J.* **23**, 3984-94.
- Isshiki, T., Takeichi, M. y Nose, A.** (1997). The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. *Development* **124**, 3099-109.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. y Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-71.
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S. y Rushlow, C.** (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target regulation. *Cell* **96**, 563-73.
- Jurata, L. W., Pfaff, S. L. y Gill, G. N.** (1998). The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 3152-7.
- Jurgens, G.** (1985). A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **316**, 153-5.
- Kadmas, J. L. y Beckerle, M. C.** (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 920-31.
- Karess, R. E. y Rubin, G. M.** (1984). Analysis of *P* transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* **38**, 135-46.
- Karim, F. D. y Rubin, G. M.** (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. y Edlund, T.** (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**, 879-82.
- Kennison, J. A. y Tamkun, J. W.** (1988). Dosage-dependent modifiers of *polycomb* and *antennapedia* mutations in *Drosophila*. *PNAS* **85**, 8136-40.
- Khalsa, O., Yoon, J. W., Torres-Schumann, S. y Wharton, K. A.** (1998). TGF- β /BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 2723-34.
- Kim, J., Sebrig, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. y Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila vestigial* gene. *Nature* **382**, 133-8.
- King-Jones, K. y Thummel, C. S.** (2005). Nuclear receptors - a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 311-23.
- Klaes, A., Menne, A., Stollewerk, A., Scholz, H. y Klämbt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149-60.
- Klein, T.** (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Current Opinion Gen. Dev.* **11**, 470-5.
- Klein, T., Couso, J. P. y Martínez-Arias, A.** (1998). Wing development and specification of dorsal cell fates in the absence of *apterous* in *Drosophila*. *Current Biol.* **8**, 417-20.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. y Simon, M.** (1985). The *engrailed* locus of *Drosophila*: In situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.
- Kukalova-Peck, J.** (1978). Origin and evolution of insect wings and their relation to metamorphosis, as documented by the fossil record. *J. Morph.* **156**, 53-126.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., Worheide, G., Leys, S. P. y Degnan, B. M.** (2006). Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol. Dev.* **8**, 150-73.
- Lasko, P. F. y Pardue, M. L.** (1988). Studies of the genetic organization of the *vestigial* microregion of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **120**, 495-502.
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L. Z., Cai, C. L., Lu, M. M., Reth, M. y cols.** (2005). Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**, 647-53.
- Lawrence, P. A., Casal, J. y Struhl, G.** (1999). The Hedgehog morphogen and gradients of cell affinity in the abdomen of *Drosophila*. *Development* **126**, 2441-9.
- Lawrence, P. A. y Struhl, G.** (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* **85**, 951-61.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. y Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-93.
- Lee, J. J., von Kessler, D. P., Parks, S. y Beachy, P. A.** (1992). Secretion and localized transcription suggest

- a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* **71**, 33-50.
- Lee, S. K. y Pfaff, S. L.** (2003). Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* **38**, 731-45.
- Lee, T. y Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Letizia, A., Campuzano, S. y Barrio, R.** (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* **134**, 1337-46.
- Leyns, L., Dambly-Chaudière, C. y Ghysen, A.** (1989). Two different sets of cis elements regulate *scute* to establish two different sensory patterns. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 227-32.
- Leyns, L., Gómez-Skarmeta, J. L. y Dambly-Chaudière, C.** (1996). *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **59**, 63-72.
- Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S. y Thomas, J. B.** (1995). Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* **121**, 1769-73.
- Madhavan, M. M. y Schneiderman, H. A.** (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **183**, 269-305.
- Mann, R. S.** (1995). The specificity of homeotic gene function. *Bioessays* **17**, 855-63.
- Mann, R. S. y Morata, G.** (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 243-71.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. y Martínez-Arias, A.** (1998). *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 557-70.
- Martín-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. y García-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *PNAS* **97**, 7888-93.
- Martín-Blanco, E., Roch, F., E., N., Baonza, A., Duffy, J. B. y Perrimon, N.** (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-47.
- Martínez, C. y Modolell, J.** (1991). Cross-regulatory interactions between the proneural *achaete* and *scute* genes of *Drosophila*. *Science* **251**, 1485-7.
- Martínez, C., Modolell, J. y Garrell, J.** (1993). Regulation of the proneural gene *achaete* by helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3514-21.
- Massari, M. E. y Murre, C.** (2000). Helix-Loop-Helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429-40.
- Masucci, J. D., Miltenberger, R. J. y Hoffmann, F. M.** (1990). Pattern-specific expression of the *Drosophila* *decapentaplegic* gene in imaginal disks is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes Dev.* **4**, 2011-23.
- Matthews, J. M. y Visvader, J. E.** (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO Rep.* **4**, 1132-7.
- McDonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J. B., Doe, C. Q. y Mellerick, D. M.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *vnd* homeobox gene specifies ventral column identity. *Genes Dev.* **12**, 3603-12.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. y Davis, R. L.** (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-8.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. y Simon, M. A.** (1997). *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorso-ventral border of the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 1073-82.
- Meinhardt, H.** (1983). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev. Biol.* **96**, 375-85.
- Micchelli, C. A. y Blair, S. S.** (1999). Dorsoventral lineage restriction in wing imaginal discs requires Notch. *Nature* **401**, 473-6.
- Michelsen, J. W., Sewell, A. K., Louis, H. A., Olsen, J. I., Davis, D. R., Winge, D. R. y Beckerle, M. C.** (1994). Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 11108-13.
- Milán, M. y Cohen, S. M.** (1999a). Notch signaling is not sufficient to define the affinity boundary between dorsal and ventral compartments. *Molec. Cell* **4**, 1073-8.
- Milán, M. y Cohen, S. M.** (1999b). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: a tetramer of dLDB and Apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Molec. Cell* **4**, 267-73.
- Milán, M. y Cohen, S. M.** (2000). Temporal regulation of Apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development* **127**, 3069-78.
- Milán, M. y Cohen, S. M.** (2003). A re-evaluation of the contributions of Apterous and Notch to the dorsoventral lineage restriction boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **130**, 553-62.
- Milán, M., Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M.** (1998). *Beadex* encodes an LMO protein that regulates

- Apterous Lim-Homeodomain activity in *Drosophila* wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* **12**, 2912-21.
- Milán, M., Weihe, U., Pérez, L. y Cohen, S. M. (2001a). The LRR proteins Capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the *Drosophila* wing. *Cell* **106**, 785-94.
- Milán, M., Weihe, U., Tiong, S., Bender, W. y Cohen, S. M. (2001b). *msh* specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* **128**, 3262-8.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. y Tabata, T. (1999). *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.
- Mitsiadis, T. A., Angeli, I., James, C., Lendahl, U. y Sharpe, P. T. (2003). Role of Islet1 in the patterning of murine dentition. *Development* **130**, 4451-60.
- Modolell, J. y Campuzano, S. (1998). The *achaete-scute* complex as an integrating device. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 275-82.
- Mohler, J. y Vani, K. (1992). Molecular organization and embryonic expression of the *hedgehog* gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* **115**, 957-71.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Itvine, K. D., Haltiwanger, R. S. y cols. (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **206**, 369-75.
- Moore, M., Query, C. y Sharp, P. (1993). Splicing of Precursors to mRNA by the spliceosome. In *The RNA world*, pp. 303-357. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morata, G. y Lawrence, P. A. (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-7.
- Morata, G. y Lawrence, P. A. (1977). The development of *wingless*, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **56**, 227-40.
- Morata, G. y Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-21.
- Morcillo, P., Rosen, C., Baylies, M. K. y Dorsett, D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 2729-40.
- Morcillo, P., Rosen, C. y Dorsett, D. (1996). Genes regulating the remote wing margin enhancer in the *Drosophila cut* locus. *Genetics* **144**, 1143-54.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S. y cols. (2006). Multipotent embryonic *isl1*⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* **127**, 1151-65.
- Morimura, S., Maves, L., Chen, Y. y Hoffman, F. M. (1996). *decapentaplegic* overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and *wingless* expression. *Dev. Bio.* **177**, 136-51.
- Moscoso del Prado, J. y García-Bellido, A. (1984). Genetic regulation of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 242-5.
- Mullins, M. C., Rio, D. C. y Rubin, G. M. (1989). *cis*-acting DNA sequence requirements for *P*-element transposition. *Genes Dev.* **3**, 729-38.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J. y Guerrero, I. (1997). Hedgehog activity, independent of Decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**, 1227-37.
- Mumm, J. S. y Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* **228**, 151-65.
- Munro, S. y Freeman, M. (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr. Biol.* **10**, 813-20.
- Nagaraj, R., Pickup, A. T., Howes, R., Moses, K., Freeman, M. y Banerjee, U. (1999). Role of the EGF receptor pathway in growth and patterning of the *Drosophila* wing through the regulation of *vestigial*. *Development* **126**, 975-85.
- Nagel, A. C., Maier, D. y Preiss, A. (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **212**, 93-8.
- Nellen, D., Affolter, M. y Basler, K. (1994). Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by *decapentaplegic*. *Cell* **78**, 225-37.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. y Basler, K. (1996). Direct and long-range action of DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Neumann, C. J. y Cohen, S. M. (1996a). Distinct mitogenic and cell fate specification functions of *wingless* in different regions of the wing. *Development* **122**, 1781-9.
- Neumann, C. J. y Cohen, S. M. (1996b). A hierarchy of cross-regulation involving *Notch*, *wingless*, *vestigial* and *cut* organizes the dorso/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **122**, 3477-85.
- Neumann, C. J. y Cohen, S. M. (1997). Long-range action of *Wingless* organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-80.
- Ng, M., Díaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. (1995). *nubbin* encodes a POU-domain protein required for proximal-distal patterning in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 589-99.

- Ng, M., Díaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. y Cohen, S. M. (1996). Specification of the wing by localized expression of the *wingless* protein. *Nature* **381**, 316-8.
- Nishioka, N., Nagano, S., Nakayama, R., Kiyonari, H., Ijiri, T., Taniguchi, K., Shawlot, W., Hayashizaki, Y., Westphal, H., Behringer, R. R. y cols. (2005). Ssd1 regulates head morphogenesis of mouse embryos by activating the Lim1-Ldb1 complex. *Development* **132**, 2535-46.
- Nolo, R., Abbott, L. A. y Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-62.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. y Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux Arch. dev. Biol.* **193**, 267-82.
- O'Kane, C. J. y Gehring, W. J. (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *PNAS* **84**, 9123-7.
- O'Keefe, D. D., Thor, S. y Thomas, J. B. (1998). Function and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing development. *Development* **125**, 3915-23.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. y Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* **165**, 716-26.
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. y Caudy, M. (1994). hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* **8**, 2743-55.
- Ostendorff, H. P., Peirano, R. I., Peters, M. A., Schluter, A., Bossenz, M., Scheffner, M. y Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* **416**, 99-103.
- Ouweneel, W. J. y van der Meer, J. M. (1973). Differentiation capacities of the dorsal metathoracic (halter) disc of *Drosophila melanogaster*. I. Normal organ map. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **172**, 149-61.
- Padgett, R. W., StJohnson, R. D. y Gelbart, W. M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81-4.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y. S., Pfaff, S. L. y O'Leary, D. D. (2004). Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell* **119**, 567-78.
- Palanker, L., Necakov, A. S., Sampson, H. M., Ni, R., Hu, C., Thummel, C. S. y Krause, H. M. (2006). Dynamic regulation of *Drosophila* nuclear receptor activity in vivo. *Development* **133**, 3549-62.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. y Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. y cols. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* **36**, 288-92.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. y Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with Hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-15.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. y Garcia-Bellido, A. (2004a). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev. Cell* **7**, 387-99.
- Pearson, M. J. (1974). The abdominal epidermis of *Calliphora erythrocephala* (Diptera). I. Polyteny and growth in the larval cells. *J. Cell Sci.* **16**, 113-31.
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massagué, J. y Hoffmann, F. M. (1994). Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a *decapentaplegic* receptor. *Cell* **78**, 239-50.
- Petruk, S. F., Jagaeva, I. V., Soldatov, A. V. y Simonova, O. V. (1998). [Cloning of the gene *leg-arista-wing complex* and analysis of its mutant derivatives in *Drosophila*.]. *Genetika* **34**, 446-8.
- Peyer, B. y Hadorn, E. (1965). Zum Manifestationmuster der Mutante „multiple wing hairs“ (*mwh*) von *Drosophila melanogaster*. *Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* **40**, 19-26.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. y Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-20.
- Phillips, R. G. y Whittle, J. R. S. (1993). *wingless* expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* **118**, 427-38.
- Poole, S. J., Kauvar, L. M., Drees, B. y Kornberg, T. (1985). The *engrailed* locus of *Drosophila*: structured analysis of an embryonic transcript. *Cell* **40**, 37-43.
- Pueyo, J. I. y Couso, J. P. (2004). Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development. *Development* **131**, 3107-20.
- Pueyo, J. L., Galindo, M. I., Bishop, S. A. y Couso, J. P. (2000). Proximal-distal leg development in *Drosophila* requires the *apterous* gene and the *Lim1* homologue *dlim1*. *Development* **127**, 5391-402.
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M. y Simpson, P. (1993). *pannier*, a negative regulator of *achaete* and

- scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* **119**, 1277-91.
- Ramain, P., Khechumian, R., Khechumian, K., Arbogast, N., Ackermann, C. y Heitzler, P. (2000). Interactions between Chip and the Achaete/Scute-Daughterless heterodimers are required for Pannier-driven proneural patterning. *Mol. Cell* **6**, 781-90.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D. y Manfrulli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **241**, 145-56.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. y Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**, 687-99.
- Rétaux, S. y Bachy, I. (2002). A short history of LIM domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol. Neurobiol.* **26**, 269-81.
- Rincón-Limas, D. E., Lu, C. H., Canal, I. y Botas, J. (2000). The level of DLDB/CHIP controls the activity of the LIM homeodomain protein apterous: evidence for a functional tetramer complex in vivo. *EMBO J.* **19**, 2602-14.
- Rodríguez, I. (2004). The *dachsous* gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent pattern formation in the *Drosophila* wing disc. *Development* **131**, 3195-206.
- Rodríguez, I. y Basler, K. (1997). Control of compartment affinity boundaries by Hedgehog. *Nature* **389**, 614-8.
- Rodríguez, I., Hernández, R., Modolell, J. y Ruiz-Gómez, M. (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *EMBO J.* **9**, 3583-92.
- Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. y Modolell, J. (1989). Expression of *achaete* and *scute* genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev.* **3**, 997-1007.
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**, 1453-9.
- Rubin, G. M. y Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Ruiz-Gómez, A., López-Varea, A., Molnar, C., de la Calle-Mustienes, E., Ruiz-Gómez, M., Gómez-Skarmeta, J. L. y de Celis, J. F. (2005). Conserved cross-interactions in *Drosophila* and *Xenopus* between Ras/MAPK signaling and the dual-specificity phosphatase MKP3. *Dev. Dyn.* **232**, 695-708.
- Ruiz-Gómez, M. y Ghysen, A. (1993). The expression and role of a proneural gene, *achaete*, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* **12**, 1121-30.
- Ruiz-Gómez, M. y Modolell, J. (1987). Deletion analysis of the *achaete-scute* locus of *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **1**, 1238-46.
- Rulifson, E. J. y Blair, S. S. (1995). *Notch* regulates *wingless* expression and is not required for reception of the paracrine *wingless* signal during wing margin neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **121**, 2813-24.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G. y cols. (2004). The DrosDel collection: a set of *P*-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 797-813.
- Ryder, E. y Russell, S. (2003). Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2**, 57-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-García, I. y Rabbitts, T. H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* **10**, 315-20.
- Sánchez, L., Casares, F., Gorfinkiel, N. y Guerrero, I. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. II. Roles of the genes *hedgehog*, *decapentaplegic* and *wingless*. *Dev. Genes Evol.* **207**, 229-41.
- Sánchez Soriano, N. y Russell, S. (1998). The *Drosophila* SOX-domain protein Dichaete is required for the development of the central nervous system midline. *Development* **125**, 3989-96.
- Sanson, B., White, P. y Vincent, J. P. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from *wingless* signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**, 627-30.
- Sato, A. y Saigo, K. (2000). Involvement of *pannier* and *u-shaped* in regulating Decapentaplegic-dependent *wingless* expression in developing *Drosophila* notum. *Mech. Dev.* **93**, 127-38.
- Sato, M., Kojima, T., Michiue, T. y Saigo, K. (1999). *Bar* homeobox genes are latitudinal prepatterning genes in the developing *Drosophila* notum whose expression is regulated by the concerted functions of *decapentaplegic* and *wingless*. *Development* **126**, 1457-66.
- Schmeichel, K. L. y Beckerle, M. C. (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **79**, 211-9.
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T. y Simcox, A. (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* **10**, 2302-13.
- Scholz, H., Deatrick, J., Klaes, A. y Klambt, C. (1993). Genetic dissection of pointed, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics* **135**, 455-68.
- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. y Kornberg, T. B. (1995). Analysis of *cubitus interruptus* regulation in

- Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* **121**, 1625-35.
- Segawa, H., Miyashita, T., Hirate, Y., Higashijima, S., Chino, N., Uyemura, K., Kikuchi, Y. y Okamoto, H. (2001). Functional repression of Islet-2 by disruption of complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth in embryonic zebrafish. *Neuron* **30**, 423-36.
- Senapathy, P., Shapiro, M. B. y Harris, N. L. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol.* **183**, 252-78.
- Sepp, K. J. y Auld, V. J. (1999). Conversion of *lacZ* enhancer trap lines to *GAL4* lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**, 1093-101.
- Sharma, R. P. y Chopra, V. L. (1976). Effect of *wingless* (*wg*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **48**, 461-5.
- Shen, J. y Dahmann, C. (2005). Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia. *Science* **307**, 1789-90.
- Shiga, T., Inoue, K. y Masuda, T. (2002). Differential expression of the islet-1 homeodomain protein in the limb bud of the chick embryo. *Anat. Embryol. (Berl.)* **205**, 223-8.
- Shirasaki, R. y Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 251-81.
- Shores, M., Orgad, S., Shmueli, O., Werczberger, R., Gelbaum, D., Abiri, S. y Segal, D. (1998). Overexpression *Beadex* mutations and loss-of-function *heldup-a* mutations in *Drosophila* affect the 3' regulatory and coding components, respectively, of the *Dlmo* gene. *Genetics* **150**, 283-99.
- Simcox, A. (1997). Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech. Dev.* **62**, 41-50.
- Simcox, A. A., Grumblin, G., Schnepf, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. y Shearn, A. (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of *vein*, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev. Biol.* **177**, 475-89.
- Simmonds, A. J. (1995). Distinguishable functions for *engrailed* and *invected* in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* **376**, 424-7.
- Simon, J., Chiang, A. y Bender, W. (1992). Ten different *Polycomb* group genes are required for spatial control of the *abdA* and *AbdB* homeotic products. *Development* **114**, 493-505.
- Simpson, P. (1990). Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* **109**, 509-19.
- Simpson, P. (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr. Op. Genet. Dev.* **7**, 537-42.
- Skeath, J. B. y Carroll, S. B. (1991). Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* **5**, 984-95.
- Soanes, K. H. y Bell, J. B. (2001). The *drosophila* *aeroplane* mutant is caused by an I-element insertion into a tissue-specific *teashirt* enhancer motif. *Genome* **44**, 919-28.
- Sockanathan, S. (2003). Towards cracking the code: LIM protein complexes in the spinal cord. *Trends Neurosci.* **26**, 57-9.
- Soto, M. C., Chou, T. B. y Bender, W. (1995). Comparison of germline mosaics of genes in the *Polycomb* group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **140**, 231-43.
- Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U. y Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* **120**, 535-44.
- St. Johnston, D. y Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201-19.
- St. Johnston, R. D., Hoffmann, F. M., Blackman, R. K., Segal, D., Grimaldi, R., Padgett, R. W., Irick, H. A. y Gelbart, W. M. (1990). Molecular organization of the decapentaplegic gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **4**, 1114-27.
- Staehling-Hampton, K., Jackson, P. D., Clark, M. J., Brand, A. H. y Hoffmann, F. M. (1994). Specificity of bone morphogenetic protein related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos by *decapentaplegic* but not *60A*. *Cell Growth Differ.* **5**, 585-93.
- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K. y cols. (2002). The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome. Res.* **12**, 1294-300.
- Stathakis, D. G., Pentz, E. S., Freeman, M. E., Kullman, J., Hankins, G. R., Pearson, N. J. y Wright, T. R. (1995). The genetic and molecular organization of the *Dopa decarboxylase* gene cluster of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **141**, 629-55.
- Stern, C. (1954). Two or three bristles. *American Scientist* **42**, 213-47.
- Stevens, M. E. y Bryant, P. J. (1985). Apparent genetic complexity generated by developmental thresholds: the *apterous* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **110**, 281-97.

- Strutt, H. y Paro, R. (1997). The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6773-83.
- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M. y Ingham, P. W. (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in *Smoothed* regulation. *Curr. Biol.* **11**, 608-13.
- Švácha, P. (1992). What are and what are not imaginal discs: reevaluation of some basic concepts (Insecta, Holometabola). *Dev. Biol.* **154**, 101-17.
- Tabata, T., Eaton, S. y Kornberg, T. B. (1992). The *Drosophila hedgehog* gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of *engrailed* regulation. *Genes Dev.* **6**, 2635-45.
- Tabata, T. y Kornberg, T. B. (1994). Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**, 89-102.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. y Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of *engrailed*, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- Tao, Y., Wang, J., Tokusumi, T., Gajewski, K. y Schulz, R. A. (2007). Requirement of the LIM Homeodomain Transcription Factor Tailup for Normal Heart and Hematopoietic Organ Formation in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* In press.
- Tautz, D. y Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Thaler, J. P., Koo, S. J., Kania, A., Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., Jessell, T. M. y Pfaff, S. L. (2004). A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* **41**, 337-50.
- Thaler, J. P., Lee, S. K., Jurata, L. W., Gill, G. N. y Pfaff, S. L. (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* **110**, 237-49.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. y cols. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat. Genet.* **36**, 283-7.
- Thor, S., Andersson, S. G. E., Tomlinson, A. y Thomas, J. B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* **397**, 76-80.
- Thor, S. y Thomas, J. B. (1997). The *Drosophila islet* gene governs axon pathfinding and neurotransmitter identity. *Neuron* **18**, 393-409.
- Tiong, S. Y. K., Nash, D. y Bender, W. (1995). *Dorsal wing*, a locus that affects dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **121**, 1649-56.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M. y Ueno, N. (1998). Role of Dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* **125**, 4215-24.
- Tomoyasu, Y., Ueno, N. y Nakamura, M. (2000). The Decapentaplegic morphogen gradient regulates the notal *wingless* expression through induction of *pannier* and *u-shaped* in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **96**, 37-49.
- Torigoi, E., Bennani-Baiti, I. M., Rosen, C., Gonzalez, K., Morcillo, P., Ptashne, M. y Dorsett, D. (2000). Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. *PNAS* **97**, 2686-91.
- Torroja, C., Gorfinkel, N. y Guerrero, I. (2005). Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *J. Neurobiol.* **64**, 334-56.
- Treisman, J. E., Luk, A., Rubin, G. M. y Heberlein, U. (1997). *eyelid* antagonizes *wingless* signaling during *Drosophila* development and has homology to the Bright family of DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **11**, 1949-62.
- True, J. R., Yeh, S. D., Hovemann, B. T., Kemme, T., Meinertzhagen, I. A., Edwards, T. N., Liou, S. R., Han, Q. y Li, J. (2005). *Drosophila tan* encodes a novel hydrolase required in pigmentation and vision. *PLoS Genet.* **1**, E63.
- Truman, J. W. y Riddiford, L. M. (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447-52.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M. y Pfaff, S. L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* **79**, 957-70.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., Kornberg, T. B., Christian, J. L. y Tabata, T. (1997). *Daughters against dpp* modulates *dpp* organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* **389**, 627-31.
- Umen, J. G. y Guthrie, C. (1995). The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* **1**, 869-85.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ympa, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. y cols. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTcf*. *Cell* **88**, 789-99.
- van den Heuvel, M. y Ingham, P. W. (1996). *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for *hedgehog* signalling. *Nature* **382**, 547-51.

- Van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K. y Posakony, J. W. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of *achaete*. *Genes Dev.* **8**, 2729-42.
- Van Doren, M., Ellis, H. M. y Posakony, J. W. (1991). The *Drosophila extramacrochaetae* protein antagonizes sequence-specific DNA binding by *daughterless/achaete-scute* protein complexes. *Development* **113**, 245-55.
- Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A. y Posakony, J. W. (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross- activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaetae*. *Genes Dev.* **6**, 2592-605.
- van Meyel, D. J., O'Keefe, D. D., Jurata, L. W., Thor, S., Gill, G. N. y Thomas, J. B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Mol Cell* **4**, 259-65.
- van Meyel, D. J., Thomas, J. B. y Agulnick, A. D. (2003). SsdP proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development* **130**, 1915-25.
- Vanolst, L., Fromental-Ramain, C. y Ramain, P. (2005). Toutatis, a TIP5-related protein, positively regulates Pannier function during *Drosophila* neural development. *Development* **132**, 4327-38.
- Villa-Cuesta, E. y Modolell, J. (2005). Mutual repression between *msh* and *Iro-C* is an essential component of the boundary between body wall and wing in *Drosophila*. *Development* **132**, 4087-96.
- Wandzioch, E., Kolterud, A., Jacobsson, M., Friedman, S. L. y Carlsson, L. (2004). Lhx2-/- mice develop liver fibrosis. *PNAS* **101**, 16549-54.
- Wang, M. y Drucker, D. J. (1995). The LIM domain homeobox gene *isl-1* is a positive regulator of islet cell-specific *proglucagon* gene transcription. *J. Biol. Chem.* **270**, 12646-52.
- Wang, M. y Drucker, D. J. (1996). Activation of *amylin* gene transcription by LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Mol. Endocrinol.* **10**, 243-51.
- Wang, S. H., Simcox, A. y Campbell, G. (2000). Dual role for epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev.* **14**, 2271-76.
- Way, J. C. y Chalfie, M. (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **54**, 5-16.
- Weihe, U., Milán, M. y Cohen, S. M. (2001). Regulation of Apterous activity in *Drosophila* wing development. *Development* **128**, 4615-22.
- Wharton, K. A., Cook, J. M., Torres-Schumann, S., de Castro, K., Borod, E. y Phillips, D. A. (1999). Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbb*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development. *Genetics* **152**, 629-40.
- Wharton, K. A., Thomsen, G. H. y Gelbart, W. M. (1991). *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *PNAS* **88**, 9214-8.
- White, R. W., M. (1984). Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**, 163-71.
- Whitworth, A. J. y Russell, S. (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **254**, 277-88.
- Wieschaus, E., Perrimon, N. y Finkelstein, R. (1992). *orthodenticle* activity is required for the development of medial structures in the larval and adult epidermis of *Drosophila*. *Development* **115**, 801-11.
- Wilson, C., Pearson, R. K., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Grossniklaus, U. y Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes & Dev.* **3**, 1301-13.
- Wilson, T. G. (1981). A mosaic analysis of the *apterous* mutation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **85**, 434-45.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. y Carroll, S. B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.
- Wolpert, L. (1989). Positional information revisited. *Development Suppl.*, 3-12.
- Wolpert, L. (1996). One hundred years of positional information. *TIG* **12**, 359-64.
- Wright, T. R. F., Hodgetts, R. B. y Sherald, A. F. (1976). The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**, 267-85.
- Wu, J. y Cohen, S. M. (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* **129**, 2411-8.
- Xu, T. y Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Xue, D., Tu, Y. y Chalfie, M. (1993). Cooperative interactions between the *Caenorhabditis elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3. *Science* **261**, 1324-8.
- Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog* and *decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.
- Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. (1996). Direct and long range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zecca, M. y Struhl, G. (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.
- Zecca, M. y Struhl, G. (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated

signaling. *Development* **129**, 1357-68.

Zeitlinger, J. y Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* **126**, 3947-56.

Zeng, C., Justice, N. J., Abdelilah, S., Chan, Y. M., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. (1998). The *Drosophila* LIM-only gene, *dLMO*, is mutated in *Beadex* alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development. *PNAS* **95**, 10637-42.

Zink, B., Engstrom, Y., Gehring, W. J. y Paro, R. (1991). Direct interaction of the Polycomb protein with *Antennapedia* regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **10**, 153-62.

Zorin, I. D., Gerasimova, T. I. y Corces, V. G. (1999). The *lawc* gene is a new member of the *trithorax*-group that affects the function of the *gypsy* insulator of *Drosophila*. *Genetics* **152**, 1045-55.

